

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
KATY LEDUC

INFLUENCE DU FACTEUR GESTATIONNEL *LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR*
SUR LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE D'UN MODÈLE
DE TROPHOBLASTE HUMAIN

DÉCEMBRE 2011

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement mon directeur et mon co-directeur de recherche, les Drs Carlos Reyes-Moreno et Éric Asselin, pour m'avoir donné toute la liberté nécessaire à l'accomplissement de ce travail. Merci aux chercheurs du Groupe de recherche en endocrinologie et oncologie moléculaire et à leurs équipes pour avoir partagé leurs connaissances et leur matériel de même que leurs techniques et leurs conseils.

Merci à mes collègues de laboratoire passés et présents, Mathieu Dufresne, Benjamin Goyer, Maxime Veillette et Geneviève Dumas, pour tous ces moments partagés sur le *bench*. À Roxanne Thibodeau, de sincères remerciements pour son aide lors de la rédaction de l'article présenté dans ce mémoire. Des remerciements particuliers vont à Andrés Felipe Gil Blanco et, surtout, à Vincent Bourassa pour leur précieuse collaboration à la réalisation du travail présenté dans ce mémoire. Merci à Vincent pour son aide à la réalisation et la rédaction de l'article. À vous deux, toute ma gratitude pour m'avoir épaulée et pour m'avoir tant appris.

Merci à Mélodie B. Plourde pour son aide à l'élaboration et au peaufinage de diverses techniques, mais aussi pour son soutien.

De chaleureux remerciements à tous ceux qui m'ont soutenue hors du laboratoire durant ces deux années, de près ou de loin. Votre contribution à ce travail et votre soutien ont été des plus importants et des plus significatifs.

RÉSUMÉ

Le *leukemia inhibitory factor* (LIF) est une cytokine gestationnelle qui serait impliquée dans l'implantation embryonnaire en régulant entre autres l'invasion des cytotrophoblastes. Toutefois, son rôle dans la fusion cellulaire (formation du syncytiotrophoblaste) et la production de l'hormone gonadotrophine chorionique (hCG) ainsi que les aspects moléculaires de son activité ne sont pas encore complètement élucidés chez les trophoblastes humains. Les effets biologiques de LIF sont connus pour être véhiculés via l'activation des différentes voies de signalisation, notamment la voie *janus kinase/signal transducers and activator of transcription* (JAK/STAT) et celle de la kinase *extracellular signal-regulated kinase-1/2* (MAPK3/1). Afin de confirmer l'idée que le LIF agit comme régulateur des fonctions endocrines inhérentes à la formation du syncytiotrophoblaste, les objectifs de cette étude étaient (a) de déterminer l'effet du LIF sur la fusion cellulaire et la sécrétion de hCG, et (b) d'évaluer la participation des voies JAK/STAT et MAPK3/1 à l'effet biologique du LIF. Nous avons utilisé le modèle de cytotrophoblaste BeWo dont la fusion cellulaire et la sécrétion de hCG ont été induites par un traitement avec la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase. Nos résultats indiquent que dans les cellules BeWo différenciées avec la forskoline, le LIF amplifie leur capacité à fusionner, mais réduit leur production de hCG tout en activant la kinase MAPK3/1 et les facteurs de transcription STAT1 et STAT3. Dans les mêmes conditions, le blocage préalable de l'activation de STAT1 et de STAT3 réduit l'effet amplificateur de LIF sur la fusion cellulaire et restaure le niveau de sécrétion de hCG induite par la forskoline. Par contre, si la kinase MAPK3/1 est inhibée préalablement, l'effet amplificateur du LIF sur la fusion est altéré, mais l'effet inhibiteur sur la sécrétion de hCG demeure. Nos résultats suggèrent ainsi que le LIF agit de manière opposée sur les deux axes de la différenciation et que cette divergence d'action dépend de l'activation de la voie JAK/STAT alors que la fusion cellulaire est dépendante de l'activation concomitante des voies JAK/STAT et MAPK3/1. À notre connaissance, il s'agit de la première étude démontrant la capacité du LIF à moduler la fusion cellulaire, à induire la phosphorylation de STAT1 et MAPK3/1 et à attribuer un rôle bien précis aux voies JAK/STAT et MAPK3/1 dans la différenciation des cellules BeWo. Nous espérons que ces observations permettront une meilleure compréhension du mode d'action des cytokines gestationnelles et des mécanismes de la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes chez l'humain.

Mots clés : placenta, trophoblaste, hCG, fusion, LIF, JAK/STAT, MAPK3/1.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES ET TABLEAU.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
REVUE DES CONNAISSANCES.....	5
1.1 Le placenta humain.....	5
1.1.1 La formation du placenta	5
1.1.2 Caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de la différenciation des trophoblastes vers la voie villeuse	9
1.2 Régulation de la croissance du trophoblaste villeux.....	13
1.2.1 Les facteurs régulant la différenciation des trophoblastes.....	13
1.2.2 Les voies de signalisation intracellulaires et la différenciation des trophoblastes	15
1.2.2.1 Les diverses voies des MAP kinases : généralités.....	15
1.2.2.2 La voie MAPK3/1 MAP kinase et la différenciation des CT...	19
1.2.2.3 La voie JAK/STAT : généralités	21
1.2.2.4 Le facteur de transcription STAT3 et la différenciation des CT	24
1.3 Le <i>leukemia inhibitory factor</i>	26
1.3.1 Découverte et rôles du LIF	26
1.3.2 Aspect moléculaire de l'action du LIF	28
1.3.3 Le LIF et l'implantation embryonnaire	29
1.4 Utilisation des cellules dérivées de choriocarcinome BeWo en tant que modèle <i>in vitro</i> de ST	32
1.5 Hypothèses de travail et objectifs	39
CHAPITRE II	
ARTICLE SCIENTIFIQUE	42
2.1 Contribution des auteurs.....	42
2.2 Résumé	42
2.3 Article scientifique.....	44

CHAPITRE III**DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... 79****3.1 Le LIF et la fusion des trophoblastes..... 80****3.2 Le LIF et la sécrétion de β hCG 84****CONCLUSION..... 90****BIBLIOGRAPHIE..... 93****ANNEXE A****RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES 113**

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure	Page
1.1 Stades du développement placentaire chez l'humain	8
1.2 Évolution spatiotemporelle de la régénération des syncytiotrophoblastes	10
1.3 Principaux facteurs régulant la différenciation des trophoblastes humains.....	14
1.4 Représentation schématique de la voie des MAPK.....	17
1.5 Représentation schématique de la voie Ras/Raf/MAP2K/(MAPK3/1).....	19
1.6 Organisation structurale et fonctions des domaines des JAK et STAT.....	23
1.7 Rôles des protéines STAT durant les stades précoces de la gestation chez les mammifères	26
1.8 Activation des voies JAK/STAT et MAPK3/1 MAP kinase par le LIF.....	29
1.9 Modèle moléculaire de la différenciation des cellules BeWo en réponse à la forskoline.	36
3.1 Modèle moléculaire proposé de l'action du LIF sur la différenciation morphologique des cellules BeWo induite par la forskoline.....	84
3.2 Modèle moléculaire proposé de l'action du LIF sur la différenciation biochimique des cellules BeWo induite par la forskoline	85
A.1 Rôle des voies JAK/STAT et MAPK3/1 MAP kinase dans la différenciation biochimique et morphologique des cellules BeWo.	113
A.2 Influence du LIF sur l'expression de l'ARNm de SOCS1 et SOCS3	114
Tableau	Page
1.1 Gènes et voies de signalisation induits par la forskoline chez les différents modèles de CT	35

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AP-2	<i>Activating protein-2</i> (Protéine d'activation-2)
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATF-1	<i>Activating transcription factor-1</i> (Facteur d'activation de la transcription-1)
CLC	<i>Cardiotrophic-like cytokine</i> (Cytokine de type cardiotrophine)
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i> (Facteur neurotrophique ciliaire)
CRE	<i>cAMP response element</i> (Élément de réponse à l'AMPc)
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i> (Protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc)
CT	Cytotrophoblaste
CT-1	<i>Cardiotrophin-1</i> (Cardiotrophine-1)
CTEV	Cytotrophoblaste extravilleuxvilleux
CTV	Cytotrophoblaste villeux
Cx-43	<i>Connexin-43</i> (Connexine-43)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
E2	17 β -estradiol
E-cad	E-cadhérine
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Acide éthylène diaminetétraacétique)
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Facteur de croissance de l'épiderme)
EGF-R	Récepteur de l'EGF
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)
FAK	<i>Focal adhesion kinases</i> (Protéines kinases d'adhésion focale)
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (Sérum de veau foetal)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isothiocyanate de fluorescéine)
GAS	<i>Interferon gamma activation site</i> (Site d'activation de l'interféron gamma)

GCMa	<i>Glial cell missing factor a</i> *
GDP	Guanosine diphosphate
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i> (Facteur stimulant la croissance de colonies de granulocytes et de macrophages)
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> (Protéine liée au récepteur du facteur de croissance-2)
GTP	Guanosine triphosphate
hCG	Hormone gonadotrophine chorionique
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HILDA	<i>Human interleukin DA</i> (Interleukine humaine DA)
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen-DR</i> (Antigène humain de leucocyte DR)
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> (Peroxydase du raifort)
IFN	Interféron
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor-I</i> (Facteur de croissance de type insulinique-I)
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
IL6ST	Glycoprotéine 130
ISRE	<i>Interferon-stimulated response element</i> (Élément de réponse stimulé par l'interféron)
JAK inhibitor I	2-(1,1-Dimethylethyl)-9-fluoro-3,6-dihydro-7H-benz[h]-imidaz[4,5-f]isoquinolin-7-one
JAK/STAT	<i>Janus kinase-signal transducers and activators of transcription</i> (Janus kinase-transducteur du signal et activateur de transcription)
JH	<i>JAK homology</i> (Homologie JAK)
JNK	<i>c-Jun amino-terminal kinase</i> (Protéine kinase amino-terminale c-Jun)

* Aucun équivalent français n'a été trouvé dans la littérature pour les noms conservés en langue anglaise.

LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i> (Facteur inhibiteur de la leucémie)
LIF-R	LIF-récepteur
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i> (Protéine activée par les mitogènes)
MAP2K	MAP kinase kinase
MAP3K	MAP kinase kinase kinase
MAPK3/1	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> (Protéine kinase régulée par les signaux extracellulaires)
M-CSF	<i>Macrophage-colony stimulating factor</i> (Facteur stimulant la croissance des colonies de macrophages)
MFSD2	<i>Major facilitator superfamily domain containing protein 2</i> (Protéine contenant un domaine de la superfamille des facilitateurs majeurs-2)
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex-II</i> (Complexe majeur d'histocompatibilité-II)
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> (Métalloprotéase matricielle)
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
OASIS	<i>Old astrocyte specifically induced substance</i> (Substance induite spécifiquement par les astrocytes âgés)
OSM	<i>Oncostatin-M</i> (Onconstatine-M)
P4	Progestérone
p300/CBP	<i>p300/CREB binding protein</i> (Protéine de liant à p300/CREB)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampon phosphate salin)
PBST	<i>Phosphate buffered saline-Tween20</i> (Tampon phosphate salin-Tween20)
PD98059	2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one
pMAPK3/1	Phospho-MAPK3/1
pSTAT1	Phospho-STAT1 »
pSTAT3	Phospho-STAT3
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PRKA	Protéine kinase A
PTK	Protéine tyrosine kinase

PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i> (Fluorure de polyvinylidène)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (Milieu de l'institut mémorial Roswell Park)
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i> (Transcriptase inverse-Réaction de polymérisation en chaîne)
SD	<i>Standard deviation</i> (Écart-type)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodecyl sulphate de sodium)
SFK	<i>Src family kinases</i> (Protéines kinases de la famille Src)
SH2	<i>Src homology-2</i> (Src homologie-2)
SHP2	<i>SH2-domain-containing tyrosine phosphatase</i> (Tyrosine phosphatase contenant un domaine SH2)
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i> (Suppresseur de la signalisation des cytokines)
SOS	<i>Son of Sevenless</i> *
Sp1	<i>Specificity protein 1</i> (Protéine de spécificité 1)
ST	Syncytiotrophoblaste
TGF β 1	<i>Transforming growth factor β1</i> (Facteur de transformation de la croissance β 1)
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i> (Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases)
TNF α	<i>Tumor necrosis factor α</i> (Facteur de nécrose tumorale α)
TSE	<i>Trophoblast-specific element</i> (Élément spécifique des trophoblastes)
Wnt	<i>Wingless-type MMTV integration site family</i> *
ZO-1	<i>Zona occludens-1</i>

* Aucun équivalent français n'a été trouvé dans la littérature pour les noms conservés en langue anglaise.

INTRODUCTION

Le parcours complexe de l'union et du développement de deux cellules, spermatozoïde et ovule, en un être doué de vie paraît, de prime abord, impénétrable. Ce n'est que vers la fin du dix-neuvième siècle que la science s'est penchée sur l'élucidation de ce phénomène de manière concrète, essentiellement au moyen d'études morphologiques comparatives. L'avènement récent de la biologie moléculaire permet des avancées étonnantes et fulgurantes quant à la compréhension des événements cellulaires et moléculaires à la base du développement de l'embryon et de ses annexes. Parmi ces derniers, le placenta revêt un intérêt tout particulier en raison de son rôle central tout au long de la grossesse. Bien plus qu'une simple barrière assurant la protection de l'embryon (et du fœtus de manière subséquente), cet organe transitoire préside aux fonctions nutritives [1], endocrines [2, 3], respiratoires [4], excrétrices [5] et immunologiques [6]. De ce fait, l'altération des fonctions placentaires, par leur nature fondamentale, présente une menace évidente du développement de l'embryon et du succès de la grossesse.

Le placenta se forme à partir des cellules en périphérie du blastocyste, c'est-à-dire les trophoblastes, lesquelles forment une assise différenciée désignée de manière générale par le terme trophoectoderme ou, plus simplement, trophoblaste. Dès l'apposition du trophoblaste à l'épithélium utérin débute sa différenciation en deux feuillets distincts. Directement en contact avec le blastocyste se dessine une assise de cellules progénitrices mononucléées, les cytotrophoblastes (CT). Ces cellules fusionnent entre elles afin de former une masse multinucléée recouvrant les CT et formant le second feuillet cellulaire, soit le syncytiotrophoblaste (ST). Ce dernier est à l'origine des précédentes fonctions placentaires et se trouve au centre des processus d'échanges entre la mère et l'embryon [7]. En effet, son action lytique lors des premiers jours de la grossesse permet d'abord l'établissement de la circulation sanguine utéro-placentaire transitoire [7]. Sa position stratégique à la surface des villosités chorionales au niveau du placenta mature, soit à l'interface entre le sang maternel et le

foetus, en fait aussi une plaque tournante du développement fœtal en étant l'intermédiaire par lequel le fœtus parvient à obtenir les éléments nécessaires à sa croissance. Par conséquent, le maintien du ST et sa régénération constante grâce à la fusion des CT sont des processus centraux de la grossesse. À la différenciation morphologique (fusion cellulaire) des CT est associée une différenciation fonctionnelle et l'activation de l'expression de certains gènes spécifiques au ST [7, 8]. Ce dernier produit alors tant des hormones stéroïdes que hormones glycoprotéiques en plus de cytokines et facteurs de croissance impliqués dans le développement foetoplacentaire [7]. Parmi les hormones glycoprotéiques se trouve l'hormone gonadotrophine chorionique (hCG) dont le rôle essentiel au succès de la grossesse est bien établi [9]. Sa sécrétion par le trophoblaste est le premier signal embryonnaire envoyé à l'endomètre et permet aussi de supporter la décidualisation des cellules du stroma endométrial, optimisant la réceptivité endométriale [10]. Plus encore, son rôle s'étend à la formation et au maintien de la structure placentaire, son action étant connue pour stimuler la différenciation morphologique des CT et favoriser la formation du ST à la source de sa propre sécrétion [7]. Tout défaut sécrétoire ou relatif à la fusion, c'est-à-dire tout défaut de la différenciation des CT en ST, peut donc mener à de sévères anomalies placentaires. Cependant, les différents acteurs et mécanismes impliqués dans la fusion des CT et l'acquisition des fonctions endocrines des ST sont encore mal compris et peu définis.

Le *leukemia inhibitory factor* (LIF) est une glycoprotéine jouant des rôles importants au sein du système immunitaire, stimulant la différenciation des cellules myéloïdes en monocytes/macrophages [11]. De manière surprenante, une fonction essentielle a été attribuée à cette cytokine produite par l'épithélium endométrial lors du processus d'implantation du blastocyste chez la souris [12]. Des femelles dont le gène du LIF a été génétiquement invalidé (*LIF-null*) sont infertiles en raison de l'absence de l'augmentation normalement observée de la sécrétion de la cytokine au moment de l'apposition du blastocyste à la muqueuse utérine [12]. Or, un apport exogène de LIF chez ces mêmes souris restaure un taux normal d'implantation [12], soutenant le rôle de la cytokine dans la réceptivité endométriale nécessaire à l'implantation. Chez l'humain, la protéine et l'acide ribonucléique messager (ARNm) du LIF sont davantage exprimés

lors de la phase lutéale du cycle menstruel, soit à l'intérieur de la plage temporelle où l'implantation du blastocyste est possible [13-15]. À l'instar de ce qui a été observé chez la souris, il existe aussi une corrélation certaine entre l'infertilité humaine et une faible production de LIF au moment d'une potentielle implantation [16]. Ceci suggère un rôle comparable à celui observé chez la souris sans cependant indiquer si son importance est aussi critique chez l'humain. La présence de l'ARNm du LIF au sein de la décidue lors du premier trimestre de la grossesse en plus de son expression à l'intérieur des villosités choriales [17, 18] soutient aussi que le rôle de cette cytokine dépasse le stade de l'implantation et qu'elle pourrait être impliquée dans la formation du placenta. En ce sens, quelques études ont démontré que le LIF peut moduler la capacité des ST à sécréter la hCG, soit en augmentant [19, 20] ou en réduisant [17, 19] sa production. Bien que le ST soit connu pour exprimer les éléments du récepteur du LIF [18], il apparaît difficile d'évaluer précisément le rôle joué par la cytokine dans le processus de différenciation des CT en ST en raison de la divergence des conclusions entourant son action. Toutefois, devant des évidences indiquant l'habileté du LIF à stimuler ou inhiber la sécrétion de la hCG, un régulateur autocrine et paracrine du développement placentaire et de la fusion syncytiale, il apparaît nécessaire de déterminer avec plus de précision l'action du LIF sur ce point. Tout facteur capable de moduler la sécrétion de la hCG apparaît posséder la capacité à modifier l'habileté des CT à régénérer le ST et, nécessairement, à stimuler ou altérer les échanges foeto-maternels [9]. De même, tout défaut de la différenciation des CT en ST représente un problème de taille limitant l'intégration de l'embryon (et du fœtus) aux tissus utérins. L'élucidation du rôle biologique du LIF lors de la différenciation des CT en ST se place donc dans un contexte visant à mieux décrire ce processus physiologique encore mal compris.

Afin de mieux diriger les lecteurs, ce mémoire-article a été divisé en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à une revue de la littérature actuelle abordant les aspects du développement du placenta et des populations de trophoblastes à sa base, de la régulation de la différenciation des CT en ST de même qu'aux divers rôles du LIF lors de l'implantation embryonnaire et du développement placentaire. Le second chapitre comporte un article scientifique récemment publié dans le journal

Biology of Reproduction pour lequel j'ai effectué l'ensemble des expérimentations en plus d'avoir rédigé le manuscrit. Enfin, le troisième chapitre aborde plus en détail certains aspects de l'article du chapitre précédent et se veut une discussion complémentaire à celui-ci.

CHAPITRE I

REVUE DES CONNAISSANCES

1.1 Le placenta humain

Le placenta est un organe éphémère indispensable au développement embryonnaire chez les mammifères. Son origine double, à la fois fœtale et maternelle, est révélatrice du contact intime s'établissant entre le fœtus et la mère durant l'ensemble de la grossesse [21]. Unique parmi tous les organes, le placenta gouverne et régule les différentes activités fonctionnelles de presque tous les organes fœtaux dès les premiers indices de leur formation jusqu'à leur plein développement. Les fonctions qu'assure cet organe sont tant nombreuses que disparates et compensent de manière transitoire l'immaturité des tissus embryonnaires et fœtaux [21]. Ainsi, il assure la régulation des échanges fœto-maternels [22], la synthèse et la sécrétion d'hormones [2, 3], l'élimination des déchets fœtaux [2] et même l'hématopoïèse [23] durant toute la grossesse tout en s'adaptant de manière progressive aux besoins métaboliques croissants du fœtus [24].

1.1.1 La formation du placenta

Le placenta humain, de type hémochorial, résulte du développement d'un système membranaire fœtal au centre duquel se retrouve le fœtus dont le simple lien avec ces membranes est le cordon ombilical [25]. Après l'interdigitation de ces membranes avec la muqueuse utérine, une zone de contact intime entre les tissus fœtaux et maternels est créée sur presque l'ensemble de la surface de l'endomètre, laquelle représente le placenta primitif dont la structure évolue au cours de la grossesse [26, 27]. La portion maternelle de cet organe, la décidue, a déjà entamé le processus de décidualisation durant la phase sécrétoire du cycle menstruel sous l'influence de la 17β -estradiol (E2) et de la progestérone (P4) et poursuit son évolution durant l'ensemble de la grossesse [28].

De manière concomitante se développe la portion embryonnaire, le chorion, à partir du mésoderme extraembryonnaire et des divers phénotypes de trophoblastes afin de former l'unité fonctionnelle placentaire, la villosité choriale. Ce dernier est le siège des échanges fœto-maternels [7].

Dès qu'un contact est établi entre l'endomètre et le blastocyste [7], les villosités choriales s'ébauchent progressivement à partir d'une population de cellules souches progénitrices, le CT. De ces derniers émergent différents types de trophoblastes spécialisés suivant l'évolution du CT selon l'une ou l'autre des voies de différenciation, soit la voie villeuse et la voie extravilleuse. La première mène à la formation d'une population de cytotrophoblastes villeux (CTV) fusionnant en une masse multinucléée, le ST, présente à l'interface foeto-maternel et fournissant une considérable surface permettant les échanges entre la mère et l'embryon [29]. Sous l'assise de CTV, une population trophoblastique se différencie à partir des CT progéniteurs et forment les CT extravilleux (CTEV), soit une population de cellules mononuclées invasives responsables de l'ancrage du placenta et du remodelage des vaisseaux sanguins maternels [29]. En bref, les CTV mènent à l'établissement des villosités choriales flottantes, en contact avec le sang maternel dans les chambres intervilluses, alors que les CTEV formeront les villosités d'ancrage pénétrant profondément à l'intérieur des tissus utérins [7, 29].

La figure 1.1 illustre plus en détail l'évolution de la structure des villosités choriales lors des trois premières semaines de la grossesse. Ainsi, durant la phase initiale de nidation (stade prélacunaire), les CT progéniteurs mononuclées attachés à la membrane basale des villosités choriales se divisent activement et fusionnent afin de former le ST, suivant la voie villeuse [7, 30]. Le maintien du ST dont l'apoptose est rapide et continue est totalement dépendant de sa régénération constante à partir des CTV sous-jacents [31]. Hautement invasif à ce stade, le ST envahit progressivement les tissus endométriaux tout en procédant à leur substitution [30, 32]. Ils ouvrent ainsi une brèche dans l'endomètre permettant au blastocyste de s'y enfoncer profondément [33]. Dès le jour huit ou neuf de la grossesse se forment des lacunes à l'intérieur du

syncytium, ce qui marque le stade lacunaire [7]. Celles-ci se creusent et forment un réseau communiquant à l'intérieur duquel se déverse le contenu des capillaires maternels aux parois endothéliales érodées en réponse à l'action lytique des ST progressant dans le stroma endométrial [7]. À ce stade, le placenta primitif est en transition entre le stade lacunaire et le stade vilieux primaire. Vers la fin de la deuxième semaine, la circulation utéroplacentaire primitive est établie alors que, simultanément, les CTV prolifèrent et forment des colonnes à l'intérieur des travées syncytiales, marquant la formation des villosités chorales primaires [7, 30]. Celles-ci s'allongent en réponse à la prolifération rapide des CTV en leur centre alors que leur arborisation débute. Sont alors formées les villosités flottantes, en périphérie, et les villosités crampons, conservant leur contact avec l'assise de trophoblastes à la base [7, 29]. Le système lacunaire établi à l'intérieur du ST évolue et se transforme en chambres intervilluses, directement irriguées via les artères spiralées [34]. La formation de ces zones à basse résistance assure un afflux sanguin important permettant de soutenir la croissance de l'embryon. Vers le quatorzième jour, les colonnes de CTV sont colonisées par des cellules mésenchymateuses provenant de la plaque chorale basale, stimulant la croissance des villosités tant en longueur qu'en largeur [7]. Les villosités secondaires sont ainsi formées (stade vilieux secondaire) suite à l'expansion du mésenchyme en périphérie et jusqu'à la base des villosités crampons [7]. Vers la fin de la troisième semaine, diverses populations cellulaires mésenchymateuses participent à la vasculogénèse, permettant le développement des vaisseaux fœtaux [7, 35] dont l'apparition détermine le stade vilieux tertiaire qui perdure jusqu'à terme. Ainsi, dans leur structure définitive, les villosités chorales contiennent en leur centre les vaisseaux sanguins fœtaux se développant dans l'axe mésenchymateux, lequel est recouvert de CTV régénérant le feuillet épithélial externe des villosités, le ST. Ce dernier est en contact direct avec la circulation sanguine maternelle à l'intérieur des chambres intervilluses formées à partir des lacunes trophoblastiques.

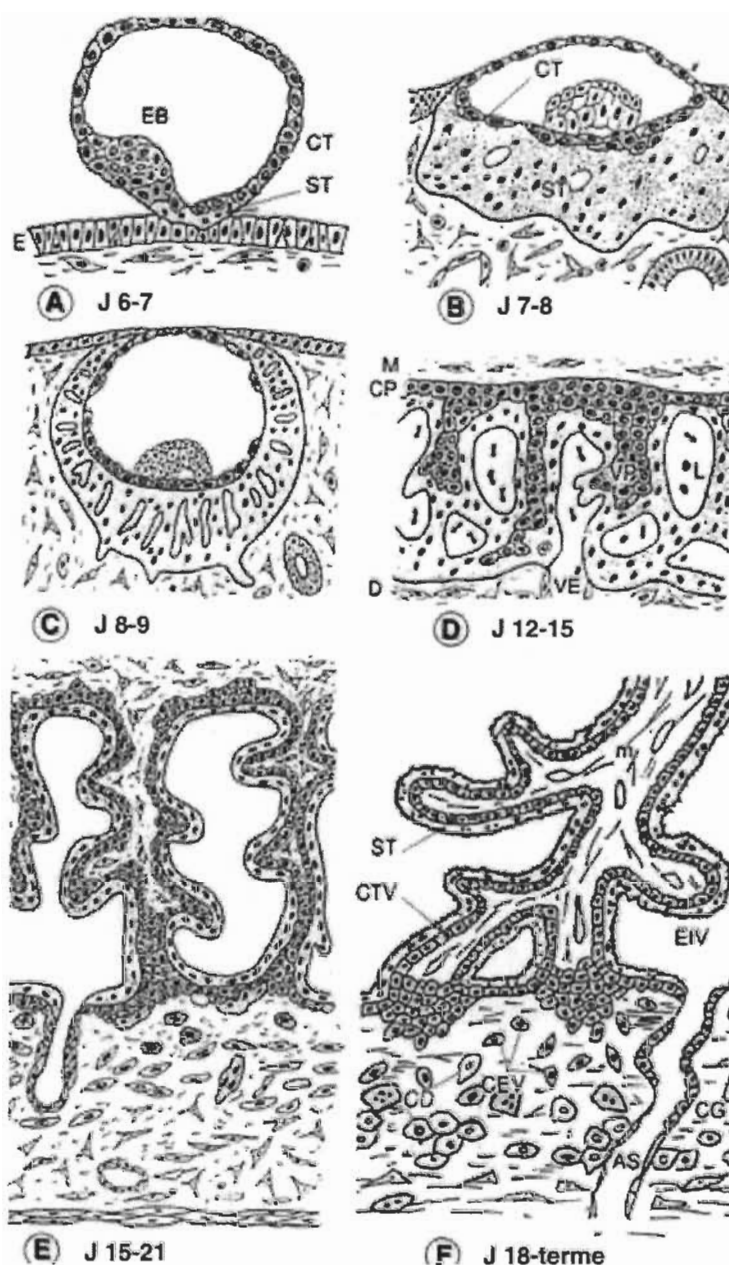


Figure 1.1 : Stades du développement placentaire chez l'humain.

A et B : stades prélacunaires; **C :** stade lacunaire; **D :** transition entre le stade lacunaire et le stade villosité primaire; **E :** stade villosité secondaire; **F :** stade villosité tertiaire, observé jusqu'à terme.

E : épithélium endométrial; EB : embryoblaste; CT : cytotrophoblaste; ST : syncytiotrophoblaste; M : mésoderme; CP : plaque choriale; L : lacune trophoblastique; VP : villosité primaire; VE : vaisseau sanguin endométrial; D : décidue; m : mésenchyme; CTV : CT villosité; CEV : CT extravillous; EIV : espace intervillous; CD : cellule déciduale; CG : cellule géante; AS : artère spiralée. Tiré de [7].

Les CTV présents à la base des villosités crampons forment des colonnes en contact avec le tissu décidual [30]. Ces colonnes représentent un site de croissance longitudinale de ce type de villosité en étant aussi le point d'origine des CTEV. Les CTV sont donc des intermédiaires tant dans la formation des ST que des CTEV. Les CTV au stade de cellules épithéliales gagnent un fort potentiel prolifératif [7, 30] et se détachent des colonnes afin de migrer vers la décidue [7]. L'invasion de ces tissus permet plus spécifiquement aux CTEV d'atteindre les artères spiralées et de participer à leur érosion et leur remodelage [7, 36]. Se faisant, les CTEV remplacent l'endothélium maternel à l'intérieur des artères et adoptent alors un phénotype de CT endovasculaires [36-38]. Par le fait même, la tunique élastique artérielle est transformée par les CTEV en une paroi atone de large diamètre [7, 35]. La faible résistance des artères spiralées transformées permet d'augmenter l'apport sanguin vers le fœtus [35] en établissant une circulation sanguine placentaire capable de soutenir la croissance fœtale. Cette communication directe avec les artères maternelles n'est toutefois établie qu'aux environs de la huitième semaine de grossesse [7] avant laquelle la circulation primitive utéroplacentaire soutient seule le développement embryonnaire.

1.1.2 Caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de la différenciation des trophoblastes vers la voie villeuse

La croissance du fœtus et, inévitablement, la progression normale de la grossesse sont toutes deux dépendantes de la formation des villosités chorales [7]. Plus spécifiquement, les ST recouvrant ces villosités apparaissent jouer un rôle critique durant la grossesse en raison de leur emplacement stratégique à l'interface fœto-maternelle. La fusion des CT représente l'étape limitant de la formation du ST. Une fois formé, le ST assure les échanges d'ions et de nutriments tout en produisant des hormones peptidiques et stéroïdes [9]. Parmi celles-ci se retrouvent la hCG et l'hormone lactogène placentaire (hPL), toutes deux essentielles au maintien et au succès de la grossesse. L'ensemble des phases à travers lesquelles évoluent les CT vers la voie villeuse se déroule à l'intérieur de compartiments précis [31], tel qu'illustré à la figure 1.2, soulignant donc le remodelage dynamique de l'épithélium trophoblastique villeux.

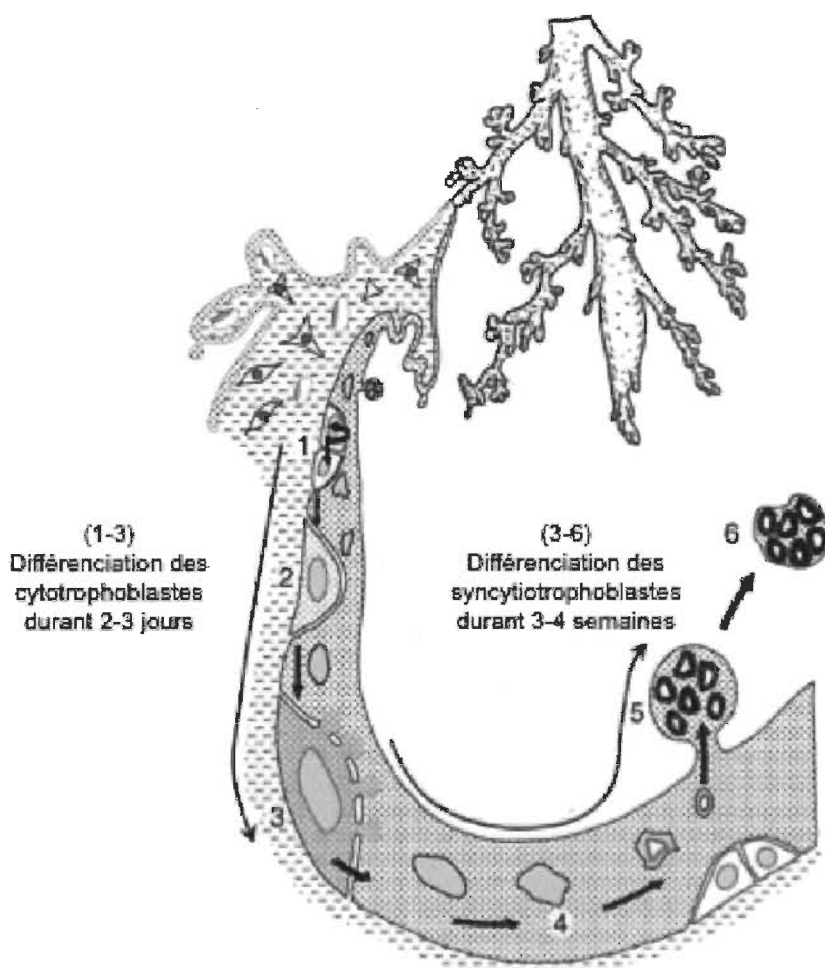


Figure 1.2 : Évolution spatiotemporelle de la régénération des syncytiotrophoblastes.

(1) Les CT proliférant activement forment des cellules filles qui poursuivent la progression normale du cycle cellulaire. (2) Les cellules filles mononucléées recrutées vers le syncytium quittent le cycle cellulaire afin de poursuivre leur différenciation. (3) Les CT pleinement différenciés participent à la régénération du syncytium en s'y intégrant par fusion cyto-syncytiale. (4) Les cellules nouvellement fusionnées poursuivent un processus de maturation visant le développement de capacités fonctionnelles propres aux ST, dont la synthèse/sécrétion d'hormones gestationnelles. (5) Les noyaux entrés en apoptose se condensent et deviennent inactifs. Ils forment des agrégats isolés à l'intérieur de sacs membraneux dérivant de fragments du syncytium, les nœuds syncytiaux. (6) Les nœuds syncytiaux se détachent du syncytium et gagnent la circulation sanguine maternelle via leur déportation dans les chambres intervilluses. Adapté de [41].

À l'origine de l'ébauche des villosités se trouve l'épithélium trophoblastique vilieux organisé en deux compartiments, interne et externe, respectivement composés

des CT et des ST [31]. Le maintien de cet épithélium est imputable uniquement aux capacités mitotiques des CT, lesquelles sont absentes chez les ST [31, 39-41]. Les CT post-mitotiques sont recrutés vers le syncytium qui sera alors régénéré par la fusion cyto-syncytiale [31, 42]. Après leur agrégation précédant leur fusion, les CT en transition voient leur morphologie modifiée en vue de la différenciation. Ils commencent alors à exprimer diverses protéines permettant la reconnaissance et les interactions cellule-cellule inhérentes à leur fusion subséquente de même que la formation de structures spécifiques facilitant la communication intercellulaire dont des desmosomes et des jonctions communicantes (*gap junction*) [43, 44]. Parmi les différentes protéines participant à la fusion se trouve la E-cadhérine (E-cad) qui apparaît jouer un rôle important dans les interactions cellule-cellule dans les agrégats de CT [44]. La régulation dynamique de son expression se fait en parallèle avec la fusion à la suite de laquelle la protéine membranaire n'est que peu ou pas détectée [44, 45]. S'ajoutent la *connexin-43* (Cx-43) et la *zona occludens-1* (ZO-1) qui revêtent une importance particulière dans la formation des jonctions communicantes entre le syncytium et les CT sous-jacents [43]. Récemment, l'importance de glycoprotéines virales, la syncytine-1 et la syncytine-2, a aussi été établie dans le processus de la fusion des CT [46]. En fait, de manière similaire à la Cx-43 et la ZO-1, l'expression de ces deux glycoprotéines augmente lors de l'agrégation et de la fusion des CT et diminue légèrement par la suite. De même, l'inhibition de l'expression des syncytines réduit tant la fusion que la différenciation des trophoblastes [47], cet effet étant particulièrement marqué en absence de la syncytine-2 [43, 48].

Pour faire suite à la fusion et à la formation du syncytium, ce dernier entre dans un processus coordonné de différenciation terminale/apoptose lors duquel les ST le composant acquièrent notamment des fonctions endocrines [31, 41]. *In vivo*, des hormones gestationnelles dont la plus importante est la hCG, spécifique à l'humain [9], sont alors synthétisées par les ST métaboliquement actifs. À cette hormone est associée un effet lutéotrophique particulièrement important pour le maintien de la grossesse lors du premier trimestre [9] de même que divers rôles stimulateurs dans l'angiogénèse [49], l'invasion des tissus utérins par les trophoblastes [50] et la formation du compartiment

syncytial [51]. L'acquisition de ces fonctions sécrétoires se fait ainsi de manière concomitante à la fusion qui représente alors une étape déterminante et terminale dans la maturation des ST [7, 41]. Cette observation souligne donc l'hypothèse selon laquelle la différenciation morphologique, c'est-à-dire la fusion cellulaire, est un préalable à la différenciation biochimique, donc à la sécrétion de hCG principalement. L'avènement simultané des deux axes de la différenciation est alors requis pour déterminer de manière certaine la transition CT vers ST et pour attester de la pleine différenciation de la cellule d'origine [31].

L'acquisition de ces fonctions sécrétoires marque l'étape terminale de la différenciation des trophoblastes villosités [41]. Les noyaux différenciés et matures entrent dans un processus visant leur séquestration vers des régions précises, les nœuds syncytiaux [31]. Ces derniers contiennent des noyaux apoptiques ou pré-apoptotiques qui seront expulsés dans les chambres intervilluses à partir desquelles ils seront par la suite envoyés vers un site extraplacentaire via la circulation sanguine maternelle, puis finalement phagocytés [31].

Le parfait équilibre entre les phases de recrutement via fusion cyto-syncytiale et extrusion apparaît essentiel, d'abord, à la régénération du syncytium, mais aussi à l'homéostasie placentaire [43]. L'incorporation constante des CT au compartiment syncytial, plus particulièrement, apparaît être un point déterminant dans le développement structural et fonctionnel du placenta. De fait, une altération des processus de fusion et, inévitablement, un déséquilibre au niveau de la synthèse/sécrétion des hormones gestationnelles, principalement de la hCG, est clairement corrélé à certaines complications gestationnelles, en lien avec une évidente insuffisance placentaire [46, 52-54]. Plus précisément, cette hormone semble être un acteur moléculaire principal quant aux divers aspects de la fusion cyto-syncytiale. Elle apparaît déterminante dans ce processus en raison de sa participation à titre de régulateur paracrine dans l'établissement de la communication cellule-cellule préalable à la fusion en stimulant la formation des jonctions communicantes [55], mais aussi en favorisant la fusion spontanée des CT avec les ST [56]. De surcroît, la hCG agit à titre de régulateur

autocrine de sa production, une augmentation de sa concentration dans l'environnement utérin limitant sa production par les ST [57]. Inévitablement, toute modification de sa sécrétion dans l'environnement utérin lors de l'implantation ou lors de l'élaboration des villosités choriales peut modifier ou compromettre le déroulement normal de la grossesse via son action indirecte sur la différenciation des CT [58]. Par exemple, un taux anormal de hCG est prédictif d'un retard de la croissance fœtale [59] et, dans les cas les plus sévères, d'un avortement spontané [60]. Or, il a été observé dans divers cas pathologiques, dont la trisomie-21, que le taux de hCG est anormal [43], ce qui augmente les risques du fœtus à croître plus lentement et la propension de la grossesse à se terminer prématurément par un avortement spontané.

1.2 Régulation de la croissance du trophoblaste villex

Les changements observés lors de la différenciation et la maturation des CT mettent en lumière une relation particulière liant la formation d'un syncytium à l'induction de la sécrétion de la hCG. Nombre de gènes et protéines sont aussi exprimés de manière concomitante à la transition CT vers ST [8]. Toutefois, les facteurs utérins et le programme génétique précis gouvernant la différenciation des trophoblastes vers la voie villexe sont peu connus et leur action, mal comprise.

Divers rôles ont été conférés à de nombreux facteurs de croissance, hormones et cytokines relativement à la différenciation des trophoblastes vers la voie villexe [8, 9]. Leur action apparait être gouvernée via l'activation de certaines voies de signalisation intracellulaire agissant de concert et assurant la progression normale de la maturation phénotypique [61-68].

1.2.1 Les facteurs régulant la différenciation des trophoblastes

Nombre d'évidences appuient l'hypothèse selon laquelle la formation du syncytium est régulée de manière autocrine et paracrine via un réseau de facteurs d'origine trophoblastique et non trophoblastique dont les principaux et leurs effets

respectifs sont illustrés à la figure 1.3. *In vitro*, la différenciation vers un phénotype vilieux est stimulée, entre autres, par l'*epidermal growth factor* (EGF), le LIF, le *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF), le *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) et l'*insulin-like growth factor-I* (IGF-I) [8, 19, 20, 69-72]. À l'inverse, le *transforming growth factor β 1* (TGF- β 1) agit en tant qu'inhibiteur de la différenciation des CT en entravant leur capacité à sécréter diverses hormones [73], mais pas des capacités de fusion [74]. Ce facteur semblerait alors diriger davantage la différenciation vers la voie extravilleuse en favorisant la formation des cellules géantes. À l'instar du précédent facteur, le LIF est aussi connu pour diriger la différenciation des CT vers la voie extravilleuse en stimulant l'expression de certaines protéases nécessaires à l'invasion [75], l'impliquant donc dans les deux voies de différenciation des trophoblastes.

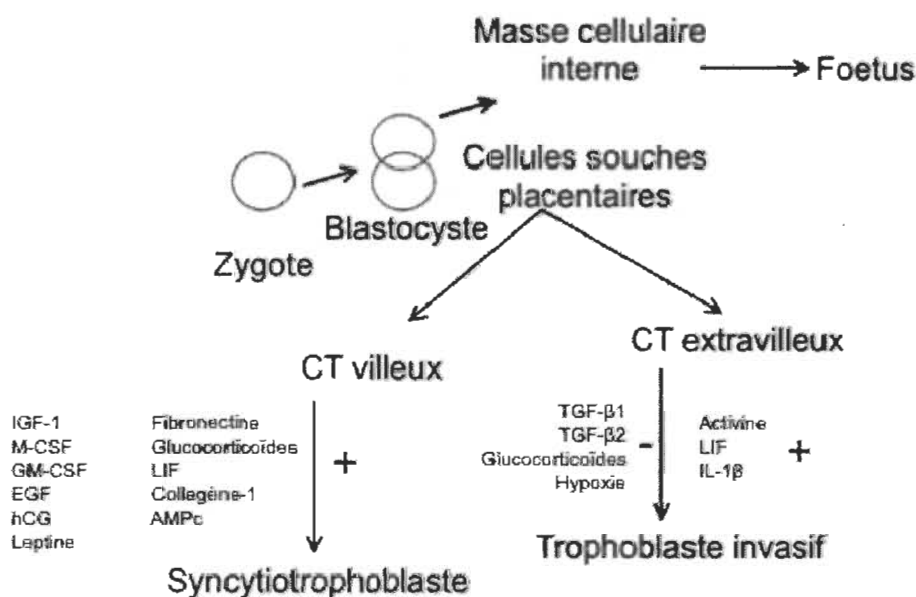


Figure 1.3 : Principaux facteurs régulant la différenciation des trophoblastes humains.

À chacune des voies de différenciation sont associés quelques facteurs stimulant (+) ou inhibant (-) l'acquisition des phénotypes trophoblastiques finaux déterminés par ces voies. IGF-1 : *insulin-like growth factor-1*; M-CSF : *macrophage-colony stimulating factor-1*; GM-CSF : *granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-1*; EGF : *epidermal growth factor*; hCG : hormone gonadotrope chorionique; LIF : *leukemia inhibitory factor*; AMPc : Adénosine monophosphate cyclique; TGF : *transforming growth factor*; IL : interleukine. Adapté de [8].

1.2.2 Les voies de signalisation intracellulaires et la différenciation des trophoblastes

De multiples voies de signalisation intracellulaire et acteurs moléculaires sont connus pour leur rôle dans divers aspects de la placentation, notamment les *Src family kinases* (SFK) [63, 64], les *Focal adhesion kinases* (FAK) [63], les *Mitogen-activated protein* (MAP) kinases [62, 65], la Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [76, 77] de même que les voies *Wingless-type MMTV integration site family* (Wnt) [78] et JAK/STAT [33, 75, 78].

Parmi ces voies de signalisation, certaines revêtent un intérêt particulier, notamment en raison de leur implication dans plusieurs processus ou dans des événements clés de la différenciation des trophoblastes. À ce titre, les MAP kinases, plus spécifiquement la voie Ras/Raf/MAP kinase kinase/(MAPK3/1) (Ras/Raf/MAP2K/(MAPK3/1)), et la voie JAK/STAT apparaissent être les acteurs principaux de la différenciation respectivement vers la voie villeuse et extravilleuse, se faisant les médiateurs des processus cellulaires inhérents à chaque axe [33, 62].

1.2.2.1 Les diverses voies des MAP kinases : généralités

L'activation de la voie des MAP kinases représente l'un des mécanismes de régulation cellulaire les plus répandus chez les mammifères. L'ensemble des eucaryotes expriment tous de multiples intermédiaires moléculaires reliées aux MAP kinases [79, 80]. Les nombreuses voies des MAP kinases peuvent être activées en réponse à un large spectre de stimulus et régulent des processus cellulaires clés dont la différenciation, la mort cellulaire, la synthèse des protéines et le cycle cellulaire [79].

Quoique chaque famille possède ses caractéristiques propres quant à l'activation, toutes les MAP kinases partagent un patron commun d'activation en trois modules de type kinase [80]. Une MAP kinase kinase kinase (MAP3K) phosphoryle une (ou plusieurs) MAP2K, laquelle phosphoryle à son tour une (ou plusieurs) MAP kinase [79, 81]. Cette dernière fait partie de l'un des cinq groupes de MAP kinases identifiés jusqu'à

présent chez les mammifères, dont les plus courantes sont MAPK-1, -3, -4, -6 et -7, *c-Jun amino-terminal kinases* (JNK)-1, -2, -3 et les quatre isoformes de la p38 kinase (α , β , γ et δ) [80, 81].

L'activation des différents modules se fait suivant la séquence illustrée à la figure 1.4. Brièvement, les MAP3K sont généralement activées via leur interaction avec une protéine de la famille de Ras ou Rho [79, 82], ou directement phosphorylées par une kinase (présente sur un récepteur tyrosine kinase ou un récepteur de cytokine) [79, 80]. Une fois activées, les MAP3K acquièrent une double activité kinase et phosphorylent une sérine et une thréonine présentes au sein d'un motif conservé à l'intérieur du sous-domaine kinase VIII d'une MAP2K [80]. Une fois activée, la MAP2K agit à titre d'enzyme à double spécificité et phosphoryle une MAP kinase sur les groupements hydroxyles des chaînes latérales d'une tyrosine et d'une sérine/thréonine présentes au sein d'un motif conservé de type Tyr-X-Thr (tyrosine-X-thréonine) à l'intérieur de la boucle d'activation du domaine kinase [80, 81]. L'action subséquente des MAP kinases vise enfin la phosphorylation de résidus sérine ou thréonine, puis d'une proline au niveau d'un effecteur précis [83], généralement un facteur de transcription, possiblement après la translocation nucléaire de la MAP kinase activée.

L'organisation en trois modules permet de réguler la spécificité de l'activation d'une voie précise menant à l'induction d'un substrat définitif par une MAP kinase [82, 84]. En raison de leur faible spécificité, les MAP3K peuvent induire l'activation de plusieurs voies MAP2K-MAP kinase alors que les MAP2K n'activent qu'une gamme restreinte de MAP kinases. Bien que les MAP2K reconnaissent une séquence précise à l'intérieur du domaine kinase des MAP kinases, cette condition n'est pas suffisante pour l'activation, qui nécessite la reconnaissance concomitante d'un motif tridimensionnel donné [82, 84]. De plus, la spécificité s'explique aussi par l'association d'une ou plusieurs kinases à diverses protéines d'échafaudage (*scaffold protein*) ségrégant tant physiquement que fonctionnellement les MAP3K des MAP2K et des MAP kinases [82]. Ceci permet aussi la séquestration de différentes kinases à l'intérieur de complexes précis agissant comme plateformes de signalisation. La formation de ce complexe

n'altère pas l'intégrité des kinases, qui conservent tout leur potentiel d'activation, mais permet la coordination de leur activité. Il semble aussi que les divers modules kinases parviennent à se réguler entre eux au moyen d'une boucle de régulation négative ou en assurant la progression du signal à travers les différents niveaux fonctionnels en activant préférentiellement certaines kinases au détriment d'autres [84]. Au final, la réponse spécifique à un stimulus via la voie des MAP kinases n'est pas une simple somme de l'activation de diverses kinases, mais bien le résultat d'un complexe et flexible processus d'intégration de l'ensemble des événements intracellulaires.

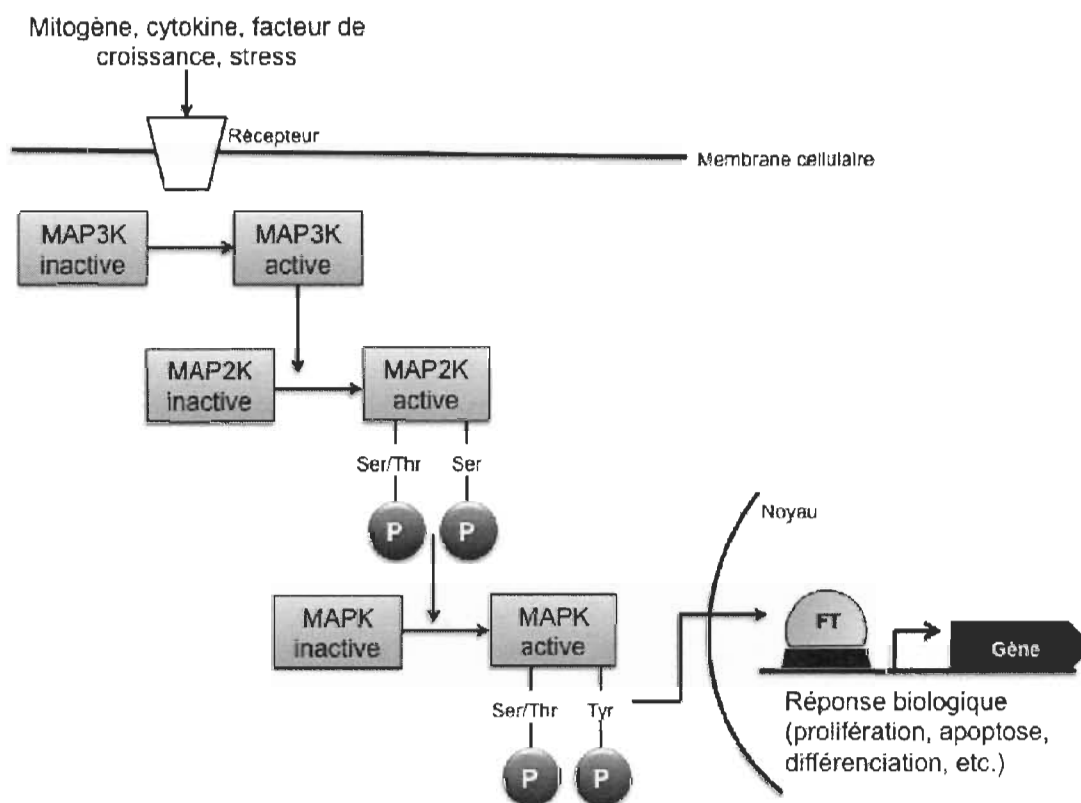


Figure 1.4 : Représentation schématique de la voie des MAPK.

Une MAP3K active une MAP2K, laquelle active une MAPK alors transloquée au noyau où elle induit l'expression d'un gène suite à l'activation d'un facteur de transcription (FT). Adapté de [80].

Parmi les différentes voies comprises dans les MAP kinases, la voie MAPK3/1 MAP kinase est, chez les mammifères, la plus connue et la mieux décrite [82]. Cette dernière est connue pour son rôle dans la différenciation de maints types cellulaires, dont

les thymocytes [85], les cellules souches neuronales [86] et les cardiomyocytes [87]. Le mécanisme d'activation et transduction du signal de cette voie est résumé schématiquement à la figure 1.5. Brièvement, l'activation du module MAPK3/1 semble possible via diverses MAP2K, lesquelles sont aussi phosphorylées en réponse à différentes MAP3K. Néanmoins, la cascade typique d'activation implique les kinases Ras/Raf/MAP2K [81, 88]. L'association d'un ligand (cytokine, hormone, neurotransmetteur ou facteur de croissance) à un récepteur de type tyrosine kinase ou couplé à une protéine G à la surface cellulaire permet l'activation transitoire de Ras [88]. Celle-ci dépend d'un cycle d'échange guanosine diphosphate/guanosine triphosphate (GDP/GTP) permettant l'activation de la protéine, laquelle nécessite aussi l'action complémentaire de protéines adaptatrices. À titre d'exemple, la transduction du signal en réponse à une stimulation avec l'EGF implique d'abord l'autophosphorylation de résidus tyrosine résultant de la liaison du ligand à son récepteur, le récepteur de l'EGF (EGF-R). Cette interaction rend accessible des sites d'ancrage pour des adaptateurs tels Shc et/ou *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) qui s'y lie via son domaine *Src homology-2* (SH2) [83, 88]. Or, Grb2 s'associe de manière stable avec le facteur d'échange GDP/GTP *Son of Sevenless* (SOS). Nécessairement, le recrutement de Grb2 à la membrane plasmique où réside Ras implique l'activation de la précédente protéine via la stimulation de l'échange du GDP auquel Ras est associée pour un GTP [88]. Ras relaie ensuite le signal à une myriade d'effecteurs cytoplasmiques en aval dont la sérine/thréonine kinase Raf-1 [88]. De manière subséquente à sa translocation vers la membrane plasmique, Raf-1 interagit avec Ras via son domaine NH₂-terminal, ce qui semble promouvoir l'activation de Raf-1 [79, 88, 89]. Cette dernière kinase se lie au domaine COOH-terminal de MAP2K1 et MAP2K2 puis les phosphoryle spécifiquement. Enfin, MAP2K1/2 phosphoryle MAPK3 et MAPK1 au niveau d'un motif Thr-Glu-Tyr (thréonine-glutamate-tyrosine) au sein de la boucle d'activation des deux précédentes kinases [79, 88]. La phosphorylation de la tyrosine, non processive, s'effectue chez MAPK3 et MAPK1 avant la phosphorylation de la thréonine [81], établissant un état d'activation seuil permettant de réguler la subséquente transduction du signal aux effecteurs finaux. MAPK3 et MAPK1 procèdent à l'activation de divers types de protéines présentes à différents endroits à l'intérieur de la cellule. Ainsi, des

protéines du cytosquelette (neurofilaments et paxilline), des protéines membranaires (calnexine) et, surtout, des facteurs de transcription (c-Fos, c-Myc et STAT3) sont rendus actifs en réaction à leur interaction avec les précédentes kinases [83].

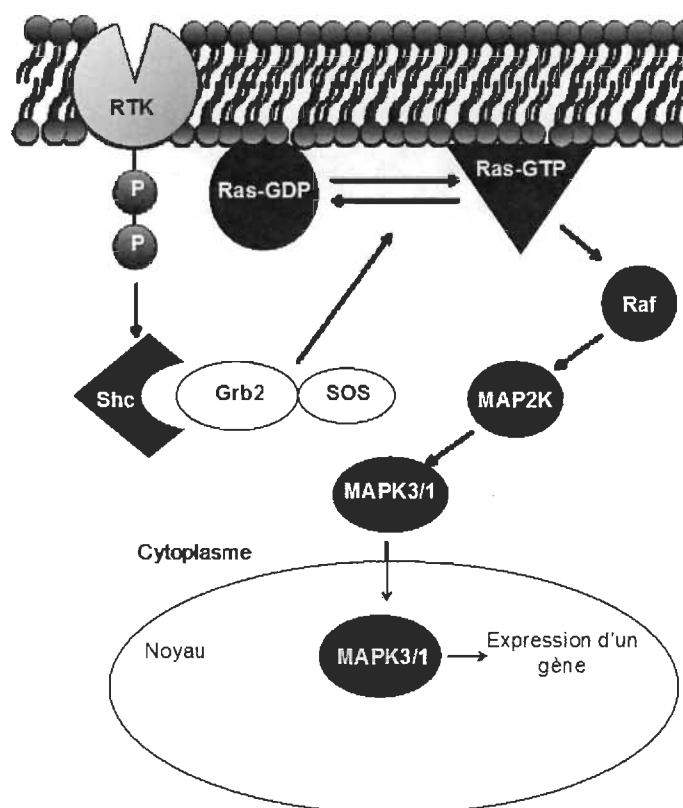


Figure 1.5 : Représentation schématique de la voie Ras/Raf/MAP2K/(MAPK3/1). Ras régule l'activation des kinases en aval. Suite à l'association d'un ligand à un récepteur de type récepteur tyrosine kinase (par exemple, l'EGF), un complexe adaptateur composé de Shc/Grb2-SOS favorise l'échange d'un GDP pour un GTP au niveau de Ras alors devenu actif. S'en suit une cascade de phosphorylation suite à l'activation de Raf par Ras. Adapté de [88].

1.2.2.2 La voie MAPK3/1 MAP kinase et la différenciation des CT

Plusieurs évidences soutiennent l'importance de MAPK3/1 dans le développement embryonnaire. D'abord, chez la souris, l'inactivation du gène *MAPK1* par recombinaison homologue au niveau des cellules souches embryonnaires s'est démontrée létale pour tous les mutants homozygotes *MAPK1*^{-/-} et en partie pour les

hétérozygotes *MAPK1*^{-/+} [90]. Toutefois, cet effet n'est pas imputable à la malformation du blastocyste, celui-ci étant normalement développé tant chez les animaux de type sauvage que les mutants, ce qui suggère que MAPK1 n'a pas un rôle indispensable lors des stades préimplantatoires [90]. Des analyses histologiques ont plutôt indiqué l'absence de formation ou la malformation de l'ectoderme extraembryonnaire dès le jour 5.5 chez les mutants [90]. Or, à l'origine de ce tissu se trouve le trophoblaste qui, en se différenciant, mène à la formation de la portion fœtale du placenta et des cellules géantes. Dès lors, ces observations fournissent des pistes quant à l'importance de MAPK1 lors du processus de différenciation des CT en ST chez l'humain. En ce sens, Daoud *et al.* [62] ont démontré l'importance de MAPK3/1 dans l'initiation du processus de différenciation morphologique (fusion des CT) et biochimique (sécrétion de hCG et hPL) au niveau de cultures primaires de trophoblastes humains. Plus précisément, leurs travaux ont indiqué que l'expression de la MAP kinase chute au fil de la différenciation des trophoblastes pour atteindre rapidement un niveau indétectable (au jour 5). Lorsque son inhibition a été faite de manière concomitante à l'induction de la différenciation, des altérations évidentes de la sécrétion hormonale et des capacités de fusion des cellules ont été remarquées. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres avec une lignée de cytotrophoblastes humains (cellules BeWo) [65]. Toutefois, l'inhibition au moyen de l'inhibiteur pharmacologique UO126 lors des trois premiers jours du processus, suivie d'une induction simple de la différenciation des CT a permis de remarquer que l'inactivation transitoire de la kinase n'a que ralenti la différenciation biochimique [62]. En effet, les capacités sécrétoires des cellules ont été rapidement restaurées suite à la levée de l'inhibition et les CT sont parvenus à sécréter autant et même davantage de hCG que les cellules contrôles n'ayant subi aucune inhibition [62]. Ainsi, en raison du rétablissement d'une activité sécrétoire normale, il apparaît manifeste que l'activation de MAPK3/1 n'est pas directement impliquée dans la synthèse hormonale, mais qu'elle permet de stimuler l'initiation de la production de l'hormone. La diminution de l'expression de la protéine totale au cours de la différenciation des CT, en plus de l'étude de Kita *et al.* [67] démontrant l'absence de la même protéine au sein du syncytium, suggère fortement que MAPK3/1 est un inducteur important, sinon central,

de la formation de la masse syncytiale et, nécessairement, du placenta, mais ne soutient pas les fonctions des ST.

D'un autre point de vue, la localisation de la protéine MAPK3/1 et de sa forme phosphorylée (lors des douze premières semaines de la grossesse) confinée au CTV [67] suppose un rôle de la kinase dans l'invasion des tissus endométriaux par les CTEV. Quelques études confirment d'ailleurs l'implication directe de la voie MAPK3/1 MAP kinase dans la régulation des fonctions de migration et d'invasion de cultures primaires et de lignées de CTEV (SGHPL-5 et HTR8-SV/neo) [36]. En effet, plusieurs facteurs connus pour promouvoir l'invasion et la migration mènent à l'activation de MAPK3/1 [91]. De manière plus claire, la hCG sous sa forme hyperglycosylée stimule l'invasion des trophoblastes (mais pas la forme régulière, soit celle sécrétée par les ST) [51] notamment au moyen de la stimulation de l'expression des gélatinases *matrix metalloproteinase* (MMP)-2 et MMP-9 [92] et permet l'activation de MAPK3/1 [93]. Or, l'activation de MAPK3/1 par la hCG a été associée à l'expression des MMP. En effet, l'inhibition de la phosphorylation de MAPK3/1 réduit la capacité de l'hormone à induire l'invasion en limitant l'expression des précédentes gélatinases [93]. La voie MAPK3/1 MAP kinase apparaît donc être déterminante dans l'acquisition des fonctions propres à chacune des voies de différenciation des CT.

1.2.2.3 La voie JAK/STAT : généralités

La voie JAK-STAT est sans contredit un point central dans la transduction du signal des cytokines, mais aussi de facteurs de croissance. La plupart des cytokines, sinon toutes, utilisent divers acteurs de cette voie, JAK ou STAT, afin d'induire l'expression de divers gènes orchestrant une kyrielle de processus physiologiques. Ainsi, l'activation de cette voie est connue pour stimuler la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire, événements ayant une importance critique au sein de processus tels l'hématopoïèse, la réponse immune et inflammatoire ainsi que la fertilité et le développement embryonnaire [94, 95].

La famille des JAK regroupe quatre protéines tyrosine kinases (PTK) d'environ 130 kDa, soit JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2, lesquelles pallient au manque d'activité kinase intrinsèque des récepteurs auxquels elles s'associent [96]. Ces enzymes sont caractérisées par leur séquence d'acides aminés divisée en sept domaines de type *JAK homology* (JH), JH1-7 [94, 96, 97] parmi lesquels le domaine COOH-terminal JH1 est responsable de l'activité PTK de ces enzymes. Lorsqu'un ligand se lie spécifiquement à son récepteur, la multimérisation de ce dernier entraîne la dimérisation de ces domaines cytoplasmiques et permet ainsi le rapprochement de deux JAK qui procèdent à leur activation mutuelle par *trans*-phosphorylation [94, 98]. Cette activation leur confère la capacité de phosphoryler une tyrosine présente au niveau des sous-unités du récepteur auquel ces JAK sont liés. Cette phosphorylation est un point critique puisqu'elle fournit, dès lors, un point d'ancrage aux protéines contenant un domaine SH2 ou *phosphotyrosine-binding*, les STAT cytoplasmiques latents possédant le premier [98, 99]. Ces STAT sont alors recrutés à proximité d'un JAK qui procède à leur activation, encore une fois via la phosphorylation d'un résidu tyrosine.

Les STAT sont une famille de sept facteurs de transcription (STAT1, -2, -3, -4, -5a et -5b et -6) ubiquitaires, à l'exception de STAT4 dont l'expression semble restreinte aux cellules myéloïdes, aux lymphocytes T et aux spermatogonies [98, 99]. Après leur activation via un JAK, ces protéines forment des homo- ou hétérodimères avant d'être transloquées vers le noyau par un mécanisme dépendant de l'importine $\alpha 5$ [96]. Les dimères interagissent ensuite avec une séquence consensus spécifique de nucléotides de la composition dudit dimère, agissant alors à titre de facteur de transcription, soit les motifs *Interferon-stimulated response element* (ISRE) ou *Interferon-gamma activation site* (GAS) et ses variants [98]. D'une masse moléculaire variant entre 84 et 113 kDa, les STAT comportent des régions structurales et fonctionnelles conservées à travers les divers membres de cette famille, dont le domaine SH2 [98]. Celui-ci est à la base de la spécificité de l'activation des STAT. Ce domaine permet l'établissement d'interactions spécifiques entre les divers STAT et la séquence contenant une tyrosine phosphorylée au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur [100]. De surcroît, c'est au sein du domaine SH2 que se retrouvent les résidus tyrosine à la source de l'activation et de la

dimérisation des STAT [96, 97]. La diversité des séquences consensus auxquelles les dimères s'associent représente un autre niveau de spécificité en raison des affinités propres à chaque STAT pour une séquence donnée [100]. De plus amples détails quant à la structure et aux fonctions des domaines composant les JAK ou les STAT sont fournis à la figure 1.6.

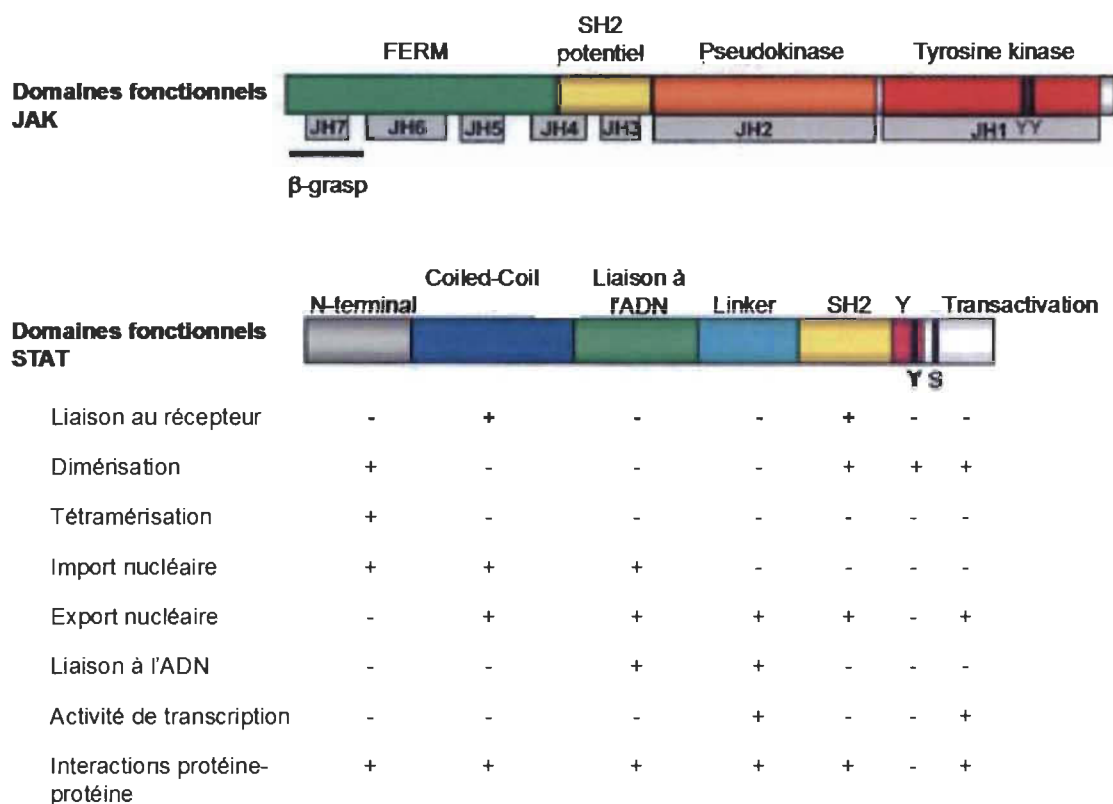


Figure 1.6 : Organisation structurale et fonctions des domaines des JAK et STAT.

Les JAK sont composés de sept domaines de type JH. Seul JH1 est imputable l'activité kinase démontrée par les JAK. JH2, le domaine pseudokinase, semble réguler l'activité catalytique de JH1. Les domaines JH3-JH7 servent essentiellement aux interactions avec diverses protéines. JH3 et JH4, ce dernier en partie, forment un site potentiel de liaison aux sous-unités de divers récepteurs, leur composition étant similaire au domaine SH2. Le domaine *four-point-one*, *ezrin*, *radixin*, *moesin* (FERM) est quant à lui responsable aussi de la fixation au récepteur et possède des fonctions régulatrices. Les STAT comportent aussi sept domaines assurant exclusivement ou non les diverses fonctions de liaison au récepteur, dimérisation, tétramérisation, import/export nucléaire, liaison à l'ADN, transcription ou encore interaction protéine-protéine. Adapté de [94] et [98].

1.2.2.4 Le facteur de transcription STAT3 et la différenciation des CT

La voie JAK/STAT participe à quelques processus de la gestation chez les mammifères en se faisant le médiateur de l'action d'une vaste gamme de cytokines, hormones et facteurs de croissance contribuant au succès de la grossesse [96]. L'activation de cette voie affecte un grand nombre de tissus différents, embryonnaires ou maternels, impliqués dans la grossesse en raison des effets multidirectionnels des ligands activateurs [96]. Ainsi, tel qu'illustré à la figure 1.7, un facteur peut activer plusieurs STAT ou, à l'inverse, plusieurs facteurs peuvent activer le même STAT [96]. Ces facteurs de transcription se font donc tant les médiateurs redondants que pléiotropiques des facteurs gestationnels et, au moyen d'interactions avec récepteurs et autres acteurs moléculaires, sont à la source du déroulement normal de la grossesse.

De manière plus précise, leur implication dans la transduction du signal du LIF et du GM-CSF, entre autres, soutient un rôle certain pour cette voie dans les interactions embryon-utérus [33, 96]. Important régulateur de l'implantation embryonnaire et de l'invasion des trophoblastes, le LIF active préférentiellement le facteur de transcription STAT3 [101]. Or, l'absence d'implantation chez des souris dont le gène du LIF a été rendu inactif soulève l'hypothèse selon laquelle STAT3 pourrait jouer un rôle important lors de l'implantation par son implication dans le processus d'invasion et/ou de syncytialisation [12, 102]. Ceci est soutenu par l'expression du facteur de transcription dès le stade de morula chez l'humain, soit en périphérie de la masse cellulaire, puis à sa présence exclusive, au stade de blastocyste, au sein du trophoblaste [103]. Ce partitionnement pourrait s'avérer une base moléculaire déterminant les potentiels de développement différentiels des deux populations cellulaires. De même, ceci soutient un rôle pour STAT3 dans la formation du placenta. Des travaux menés chez le rat soutiennent aussi que l'activation de STAT3, par son patron d'activation spatial et temporel, joue un rôle considérable lors de la décidualisation et l'établissement du contact blastocyste-utérus [104]. En effet, un niveau important de phosphorylation du facteur de transcription est observé au jour 4 au sein de l'épithélium luminal glandulaire puis se déplace vers le tissu stromal au jour 5 [104], suivant respectivement le moment de l'implantation du blastocyste et l'initiation du processus d'invasion des tissus utérins.

par les CT. Une intéressante étude menée chez des souris déficientes en STAT3 illustre de manière éloquente l'aspect essentiel de ce dernier dans la transduction des signaux à la source du maintien du développement embryonnaire [105]. Alors que le développement des tissus embryonnaires n'est que peu affecté avant le jour 6.0, la taille de la masse cellulaire interne étant toutefois inférieure chez les souris mutantes, une rapide dégénérescence de l'embryon débute au jour 6.5, d'où l'altération évidente de la formation du mésoderme et la mort de l'embryon [105].

De plus amples évidences provenant d'études *in vitro* associent la voie JAK/STAT directement au processus de différenciation des CT. L'activité de STAT3, en particulier, semble régulée en parallèle à l'invasion des CTEV, c'est-à-dire que son activation diminue au fil de la progression de la grossesse de manière concomitante à la diminution des capacités invasives des trophoblastes [106]. Plus encore, la comparaison entre des cultures primaires de CT au premier trimestre et des carcinomes a nettement démontré, chez les seconds, une activation constitutive de STAT3 par le moyen d'une augmentation marquée de son activité de liaison à l'ADN, laquelle apparaît à la source des capacités invasives magnifiées des cellules carcinomales [106]. Ainsi, le LIF, par son aptitude à activer STAT3, a été associé à la stimulation de l'invasion des CT, notamment en raison de son potentiel régulateur de protéines impliquées directement ou indirectement dans ce processus [101]. En effet, la cytokine limite l'expression de la *tissue inhibitor of metalloproteinase-1* (TIMP-1) dont l'action inhibitrice limite l'activité de toutes les MMP et, de manière préférentielle, de la MMP-9 [107] dont le rôle essentiel dans les capacités invasives de CTEV est reconnu [108]. Cependant, l'activité de STAT3 a aussi été associée, chez d'autres modèles de trophoblastes, à l'augmentation de l'expression de TIMP-1 [109]. L'ambiguïté de la fonction précise du facteur de transcription semble ainsi dépendre du modèle comme du contexte cellulaire. Sur ce point, donc, de plus amples études sont nécessaires afin de statuer sur le rôle du facteur de transcription de façon plus certaine.

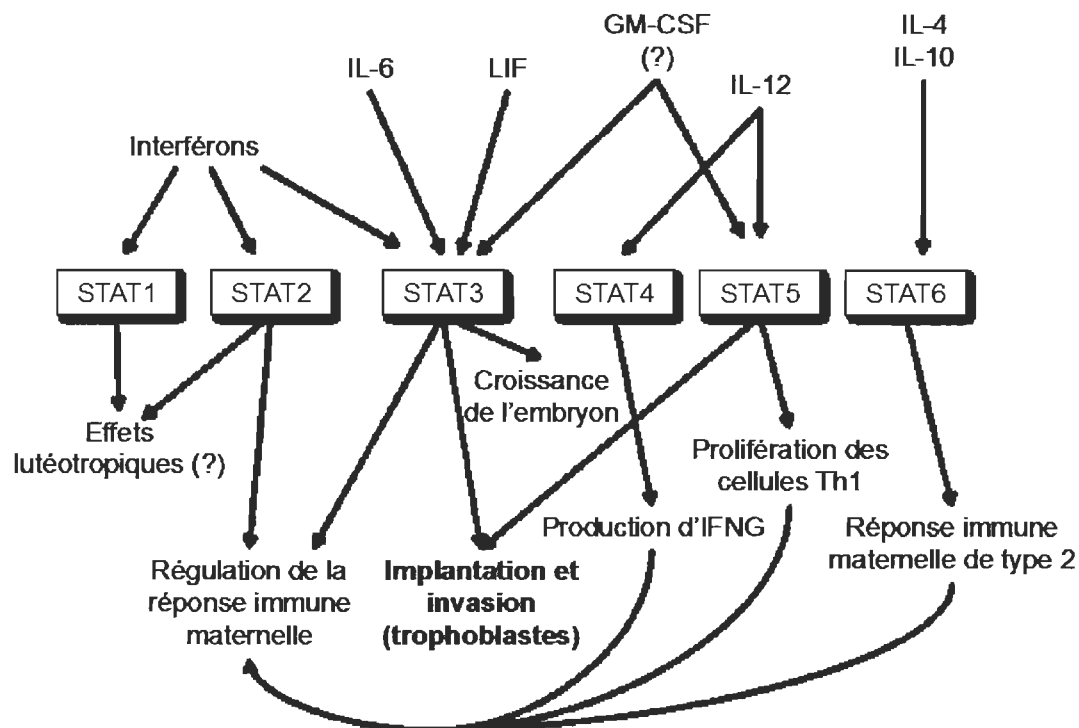


Figure 1.7 : Rôles des protéines STAT durant les stades précoces de la gestation chez les mammifères.

Les STAT sont activés en réponse à une vaste gamme de ligands connus pour leurs rôles durant la gestation et agissent ainsi à titre de médiateurs des effets associés à ces facteurs gestationnels. En raison de la diversité des ligands activant ces facteurs de transcription, les STAT induisent un large spectre d'effets au sein de plusieurs tissus embryonnaires et maternels. Adapté de [96].

1.3 Le leukemia inhibitory factor

Le LIF est une glycoprotéine hautement glycosylée démontrant un large spectre de fonctions biologiques [110-112]. D'abord identifié par Gearing *et al.* en 1987 par sa capacité à induire la différenciation des cellules leucémiques myéloïdes murines M1 en macrophages [11], un nombre croissant de rôles disparates a depuis été attribué au LIF.

1.3.1 Découverte et rôles du LIF

Les premières études *in vitro* démontrant un rôle potentiel du LIF dans la régulation de la croissance et de la différenciation de cellules hématopoïétiques attirèrent

d'abord beaucoup d'attention. Cependant, les conclusions contradictoires ressortant de ces travaux [113-116] ne permirent pas d'établir clairement l'importance du LIF dans l'hématopoïèse.

Les travaux de Metcalf *et al.* chez la souris démontrèrent un effet intéressant de la cytokine *in vivo* [117]. Une augmentation dose-dépendante du taux sanguin de plaquettes, du nombre de mégakaryocytes et de leurs cellules progénitrices suggéra une application clinique importante comparable à celle de l'interleukine (IL)-6 et l'IL-11 [118], la dernière ayant toutefois été la seule approuvée.

Des travaux entourant les cellules souches embryonnaires mirent en lumière une fonction clé du LIF, soit son action dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires d'origine murine [119, 120]. Cette découverte permit un avancement considérable des études reliées aux cellules souches et facilita la génération de populations de souris mutantes. Il ne fût pas conclu que le LIF ait un effet similaire sur les cellules souches embryonnaires humaines qui paraissent, étonnamment, ne démontrer aucune dépendance à cette cytokine [121]. Quoiqu'il en soit, la réponse des cellules souches embryonnaires murines à la cytokine suggéra l'importance singulière de cette dernière non seulement dans la culture *in vitro*, mais aussi dans la régulation du développement et de la prolifération des embryons lors des stades précoces de la gestation. Il apparut alors évident que la cytokine pourrait jouer un rôle non négligeable dans les processus physiologiques liés à la gestation, notamment l'implantation du blastocyste.

Au fil des années fût associé au LIF un nombre impressionnant de rôles au sein de plusieurs tissus et organes, notamment dans le métabolisme osseux [122, 123], dans la régulation de fonctions endocrines hypophysaires [124, 125] de même que dans la différenciation du follicule ovarien [126] et des spermatocytes [127, 128].

1.3.2 Aspect moléculaire de l'action du LIF

Le LIF est un membre de la famille des cytokines de type IL-6 à laquelle appartient aussi l'IL-11, l'*oncostatin-M* (OSM) [129], la *cardiotrophin-1* (CT-1), le *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) et la *cardiotrophin-like cytokine* (CLC) et l'IL-6. Ces facteurs se lient à divers récepteurs membranaires homo- ou hétérodimériques et partagent tous un élément commun, soit la glycoprotéine 130 (IL6ST), jouant un rôle de plateforme de transduction du signal [94]. À cet élément s'associent d'autres sous-unités réceptrices formant, au final, un récepteur à haute affinité spécifique à chaque cytokine [94]. Dans le cas précis du LIF, le récepteur se compose d'une sous-unité IL6ST et d'une sous-unité LIF-récepteur (LIF-R) [94]. Celles-ci comportent respectivement les domaines cytoplasmiques *box1/box2* et *pseudo-box1/box2* auxquels les JAK peuvent se lier [130], tel qu'illustré à la figure 1.8. Les kinases JAK1, JAK2 et TYK2, mais pas JAK3, sont susceptibles d'être activées en réponse à la précédente cytokine [130]. Ces dernières sont connues pour activer chez les trophoblastes humains, qu'ils s'agissent de cultures primaires, de cellules immortalisées ou de cellules dérivées de choriocarcinomes, principalement STAT3, mais aussi STAT1 [75, 101, 109, 131]. Enfin, ces facteurs de transcription induisent l'expression d'un large spectre de gènes, dont celui correspondant à la protéine *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)-3, soit l'un des principaux régulateurs négatifs de la voie JAK/STAT [132, 133]. De cette manière, le LIF procède lui-même à la régulation de son mécanisme d'action au moyen d'une cible limitant directement l'activation de sa propre réponse.

Les voies des MAP kinases sont aussi induites en réponse au LIF chez divers types cellulaires dont les trophoblastes, notamment la voie MAPK3/1 MAP kinase [131, 134, 135] (voir figure 1.8). Cependant, le mécanisme précis par lequel cette activation de MAPK3/1 est possible n'est pas clair dans le cas du LIF. Plusieurs études fournissent des pistes d'élucidation de ce mécanisme qui apparaît être possible via la *SH2-domain-containing tyrosine phosphatase* (SHP2) ou Gab1 agissant à titre d'adaptateur entre IL6ST et le complexe Grb2/SOS [94, 136, 137], ce dernier activant la voie Ras/Raf/MAP2K/(MAPK3/1).

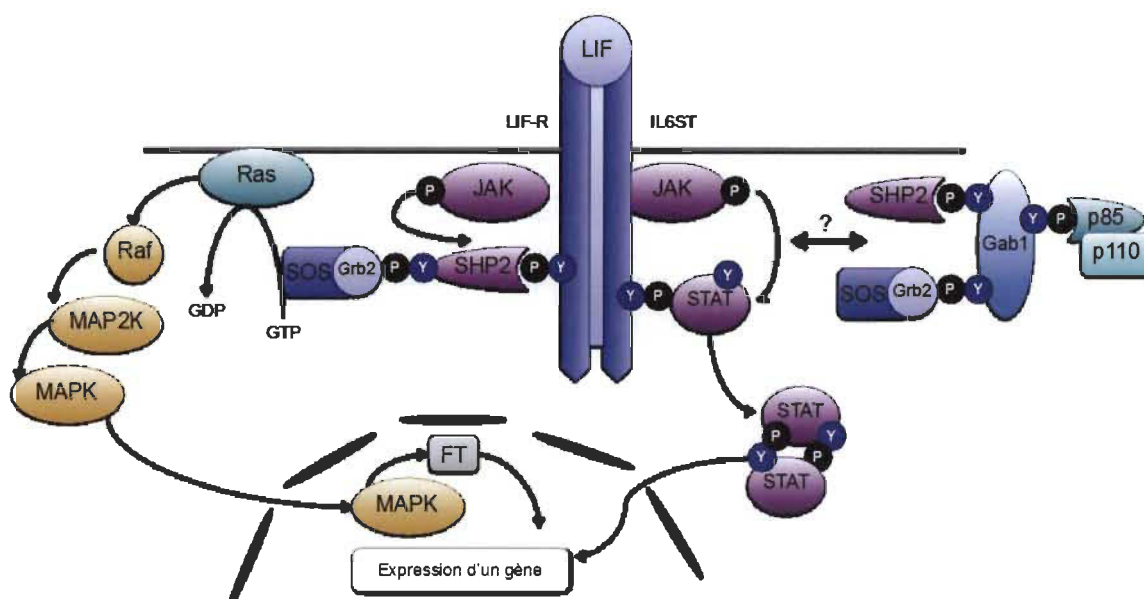


Figure 1.8 : Activation des voies JAK/STAT et MAPK3/1 MAP kinase par le LIF. La liaison du LIF au récepteur induit la dimérisation de IL6ST et LIF-R, puis l'activation des JAK qui phosphorylent les sous-unités du récepteur et les STAT. Ces derniers se dimérisent avant d'être transloqués au noyau où ils induisent l'expression de gènes. Les phosphotyrosines du récepteur peuvent aussi servir de point d'ancrage pour SHP2 ou Gab1 à l'origine de la voie Ras/Raf/MAP2K/(MAPK3/1). FT : facteur de transcription. Adapté de [94].

1.3.3 Le LIF et l'implantation embryonnaire

Alors que l'implantation du blastocyste est soumise à un contrôle hormonal, il apparaît de plus en plus évident que ces dernières utilisent diverses cytokines à titre de médiateurs, lesquelles jouent un rôle central dans ce processus physiologique. Le LIF, à ce point, est un exemple éloquent de médiateur de l'action de l'E2 lors du stade préimplantatoire.

Des évidences directes quant au rôle essentiel du LIF dans l'implantation proviennent d'études réalisées chez des souris femelles dont le gène correspondant au LIF a été génétiquement invalidé [12]. La mutation, quoique viable, entraîne des conséquences catastrophiques sur l'implantation embryonnaire. En effet, celle-ci est rendue impossible chez les femelles *LIF*^{-/-} en dépit du fait que le blastocyste, lorsque transféré à une souris pseudogestante non mutante, puisse s'implanter normalement [12].

De plus, un apport en LIF chez les femelles *LIF*^{-/-} au moment de l'implantation suffit pour restaurer le déroulement normal du processus [12]. Le rôle du LIF ne semble toutefois pas se limiter au stade préimplantatoire, la cytokine jouant un rôle important subséquemment, soit lors de la placentation. Des embryons *LIF-R*^{-/-} peuvent s'implanter, mais meurent durant la période périnatale en raison de l'altération de la structure placentaire, plus précisément de la labyrinthine [102, 138]. Un accroissement important de la sécrétion de la cytokine coïncide exactement au moment de l'entrée du blastocyste dans la cavité utérine en vue de l'implantation au jour 4 [139]. L'expression de la protéine ou de l'ARNm correspondant au LIF est cependant indépendante de la présence du blastocyste et est tributaire d'une régulation maternelle [139]. Il semble donc manifeste que cette cytokine est, chez la souris du moins, un intermédiaire important du dialogue entre la mère et le fœtus.

De telles évidences chez l'humain ne sont pas établies en raison de l'indiscutable impossibilité de procéder aux expérimentations précédemment décrites chez la souris. En dépit du fait que l'importance du LIF ne soit pas déterminée de façon aussi éloquente, un ensemble grandissant d'indices portent à croire que la cytokine pourrait aussi jouer un rôle dans l'optimisation de la réceptivité utérine et de la différenciation des CT chez l'humain. Dans un premier temps, à l'instar des résultats obtenus chez la souris [139], l'expression endométriale du LIF varie en fonction des phases du cycle menstruel chez l'humain [13, 140]. En effet, un niveau faible, voire même l'absence totale de l'ARNm correspondant au LIF, est observé lors la phase proliférative du cycle menstruel [13, 14, 140]. Suite à l'ovulation, toutefois, tant l'expression du transcrit que de la protéine évoluent pour devenir maximales entre les jours LH+5 et LH+11 [13, 14, 18, 141], coïncidant, comme chez la souris, au moment de l'implantation du blastocyste [15]. Même l'activité biologique du LIF durant le cycle menstruel, faible durant la phase proliférative, augmente durant la phase sécrétoire [142]. L'ensemble de ces observations établit de manière nette une certaine importance du LIF à titre de régulateur dynamique des fonctions physiologiques de l'endomètre. Ainsi, la faible présence de la cytokine dans l'environnement utérin pré-ovulatoire apparaît stimuler la prolifération et la croissance de l'endomètre. Son augmentation marquée post-ovulation et, surtout, sa

présence à un niveau maximal à l'intérieur de la plage temporelle correspondant à la fenêtre d'implantation (jours LH+5 à LH+11) indique l'action autocrine et paracrine du LIF quant au remodelage cellulaire et moléculaire de l'épithélium endométrial en vue d'établir une réceptivité utérine optimale.

Dans un second temps, des résultats forts intéressants soutiennent que le rôle du LIF ne se limite pas à la simple préparation de l'endomètre et qu'il pourrait ainsi être un élément déterminant de la synchronie du développement endométrial et embryonnaire. En effet, la culture *in vitro* d'embryons de souris en présence du LIF facilite leur développement jusqu'au stade de blastocyste [143] et apparaît même, chez les bovins, stimuler l'éclosion, limiter la dégénération du blastocyste et augmenter les taux de succès de son implantation [144]. Des analyses par *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) ont permis de déterminer la présence des deux composantes du récepteur du LIF chez des embryons humains au stade de blastocyste [145], mais pas de l'ARNm correspondant à la cytokine [18]. Ceci suggère une action embryotrophique potentielle de la cytokine. Ainsi, le blastocyste, lors de son arrivée dans la cavité utérine, peut répondre à la cytokine alors exprimée à un taux optimal. Considérant l'ensemble des précédentes observations, il apparaît manifeste que le LIF est une plaque tournante lors de l'implantation embryonnaire en permettant le remodelage simultané de l'endomètre et du blastocyste tout en étant un point commun dans la communication de chacune des parties. Cependant, l'importance du LIF se limite-t-elle uniquement à ces processus physiologiques préimplantatoires?

Étonnamment, si l'implantation embryonnaire se produit, la sécrétion du LIF par l'épithélium glandulaire, alors principal siège de son expression, est réduite à un niveau très faible alors que l'expression du transcrite est fortement augmentée au niveau stromal dont il était jusqu'alors absent [18, 146]. Ce décalage du siège de l'expression du LIF vers les tissus sous-jacents à l'épithélium endométrial de même qu'au niveau des villosités chorales lors du premier trimestre [17] soutient le rôle du LIF déjà connu et abondamment documenté quant à l'acquisition des capacités invasives des CTEV [18, 33, 75, 101, 109]. En effet, diverses populations de CT expriment fortement le transcrite

et la protéine du LIF-R, dont les CT et les ST [18], mais pas l'ARNm du LIF [18] ni la protéine [19]. Nécessairement, les CT voient potentiellement leur comportement modulé par la cytokine dont l'expression se fait strictement au sein des tissus qu'ils traversent et remodelent. De plus, le transcrit du LIF-R est exprimé par les villosités chorales durant le premier trimestre et son expression est maintenue dans le placenta au second trimestre et à terme [17], suggérant non seulement une fonction du LIF lors de l'invasion, mais aussi à des fins de soutien de la structure placentaire et, forcément, de la régénération du syncytium.

D'ailleurs, concernant ce dernier point, des effets divergents ont été associés au LIF, rendant donc son rôle ambigu. Tel que mentionné précédemment, la formation des ST implique nécessairement la fusion cyto-syncytiale à laquelle est liée l'acquisition de fonctions sécrétoires, notamment l'augmentation de la synthèse de la hCG [31]. Puisque cette hormone agit à titre de stimulant autocrine et paracrine de la formation du syncytium [147], il va de soi que son augmentation est révélatrice de la différenciation terminale des CTV en ST, d'où son rôle de marqueur de différenciation. Or, certains auteurs ont décrit l'action stimulante du LIF quant à la sécrétion de hCG [20] alors que d'autres ont plutôt observé l'effet inverse [17, 19], liant donc à la fois la cytokine à la stimulation et à l'inhibition de la formation du syncytium. Les travaux de Ren *et al.* apportent toutefois sur ce point une piste de solution, l'action du LIF quant à la sécrétion de la hCG semblant dépendre de l'évolution temporelle de la grossesse [148]. Ainsi, la cytokine agirait comme stimulant de la sécrétion de hCG lors du premier trimestre, mais comme inhibiteur de ce même paramètre lors du second trimestre.

1.4 Utilisation des cellules dérivées de choriocarcinome BeWo en tant que modèle *in vitro* de ST

L'étude de l'effet de divers facteurs impliqués dans le phénomène global de placentation humain et de son mécanisme d'action moléculaire, c'est-à-dire l'élucidation des voies de signalisation utilisées dans la transduction de leur signal, revêt un caractère essentiel dans l'optique d'une meilleure compréhension des sources de pathologies liées. Divers modèles sont utilisés de manière courante afin de réaliser de telles études,

certains présentant cependant d'évidentes limites [30, 149-151]. L'utilisation de modèles animaux, surtout la souris, se révèle intéressant quant à l'étude des gènes impliqués lors du développement placentaire, similaire entre l'humain et la souris. Néanmoins, le processus d'invasion des tissus utérins par les CTEV n'est que superficiel chez la souris en comparaison à celui ayant lieu chez l'humain [152]. De même, en raison des composantes hormonales différentes régulant la placentation [152], les études fonctionnelles quant à ces dernières apparaît difficile à extrapoler d'une espèce à l'autre.

Les méthodes les plus communes visant l'étude des mécanismes de régulation de la différenciation des trophoblastes humains et des fonctions associées, soit la fusion et la synthèse de diverses hormones, dérivent surtout d'approches *in vitro*. Diverses méthodes ont alors été développées, soit la culture d'explants placentaires, de chorion lisse ou la purification de CT à partir de placentas humains. Cependant, en raison de l'hétérogénéité de ces systèmes, des alternatives, plus homogènes cette fois [153], ont été mises au point. Ainsi, les lignées cellulaires dérivées de choriocarcinomes, principalement les cellules JEG-3, Jar et BeWo, sont rapidement devenues des modèles très pertinents pour étudier la différenciation des trophoblastes. La lignée BeWo a été développée à partir d'une tumeur placentaire (choriocarcinome) humaine maintenue à l'origine chez le hamster. Le développement d'une co-culture de ces tumeurs avec des explants placentaires humains a permis d'établir la lignée BeWo [154]. Les lignées JEG-3 et Jar, quant à elles, originent directement d'une tumeur placentaire trophoblastique [155]. Alors que les lignées JEG-3 et Jar sont davantage utilisées à titre de modèle de trophoblaste invasif, les cellules BeWo, par leur capacité de fusion, absente chez les JEG-3 et Jar, sont largement employées à titre de modèle de syncytialisation [48, 65, 156, 157]. Cependant, ces cellules présentent la caractéristique d'être incapable de se différencier spontanément, contrairement aux cultures primaires de CT [151]. Ainsi, l'induction de leur différenciation en ST nécessite un traitement avec l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) ou la forskoline. Ce dernier facteur est un activateur de l'adénylate cyclase dont l'activité permet d'augmenter le taux intracellulaire d'AMPc [158]. Considérant que l'acquisition des fonctions endocrines et de la capacité de fusion dépend de l'activation de voies AMPc-

dépendantes [159], dont la voie AMPc/protéine kinase A (PRKA), un traitement avec les précédents facteurs permet à la fois la différenciation morphologique (fusion) et biochimique (sécrétion de hCG) des cellules BeWo. À ce sujet, le tableau 1.1 résume les principaux gènes et protéines dont l'expression est induite au cours de la différenciation des CTV en ST et/ou lors de la différenciation des cellules BeWo et indique les voies de signalisation impliquées dans ce processus. D'abord, il apparaît manifeste que l'activation de la PRKA (AMPc-dépendante) représente un événement clé découlant de l'action de la forskoline en raison de son titre de médiateur principal des effets biologiques de l'AMPc (voie AMPc/PRKA) [160]. D'ailleurs, une abondante littérature fait référence à la voie AMPc/PRKA en tant que pilier de la différenciation morphologique et biochimique des cellules BeWo [61, 65, 159-161]. Des rôles importants ont aussi été suggérés pour les voies MAPK3/1 et p38 MAP kinases dans la régulation de la fusion syncytiale et la sécrétion de la hCG des cellules BeWo [62]. Or, ces deux voies sont aussi activées en réponse à la forskoline [65]. Cependant, une importante concentration de forskoline (100 μ M) est requise afin de remarquer l'activation de MAPK3/1 et p38 [65]. Tel qu'illustré à la figure 1.9, il apparaît aussi que la PRKA peut potentialiser l'activation AMPc-dépendante de MAPK3/1 et p38. En retour, ces deux dernières kinases peuvent stimuler la phosphorylation de facteurs de transcription activés par la PRKA et/ou augmenter la transcription de gènes impliqués dans la fusion ou la sécrétion hormonale [65]. Au final, les voies AMPc/PRKA de même MAPK3/1 et p38 MAP kinases agissent de concert, soit en parallèle ou de manière coopérative, à la différenciation morphologique et biochimique des cellules BeWo.

Tableau 1.1

Gènes et voies de signalisation induits par la forskoline chez différents modèles de CT

Facteurs	Modèle	Fonctions	Références
AP-2	CT, culture primaire	Stimule la transcription du gène de la sous-unité β de la hCG	[50]
ATF-1	CT, culture primaire	Stimule l'expression de la sous-unité α de la hCG	[161]
CREB	BeWo	Augmente l'activité transcriptionnelle de GCMA	[61]
	CT, culture primaire	Stimule l'expression de la sous-unité α de la hCG	[161]
MAPK3/1	BeWo	Régule l'expression de l'ARNm de la syncytine-1	[65]
		Stimule la phosphorylation de CREB et ATF-1	[65]
		Régule l'expression de la hCG	[65]
GCMA	BeWo	Formation des ST Stimule la fusion des trophoblastes Stimule l'expression de syncytine-1 et -2 et de MFSD2 Stimule l'immunoréactivité de la Cx43	[65] [61] [68,163] [68]
	Souris	Formation de la labyrinthine	[163]
MFSD2	BeWo	Récepteur de la syncytine-2	[65]
OASIS	BeWo	Stimule la transcription de GCMA	[65,163]
p38	BeWo	Régule l'expression de l'ARNm de la syncytine-1 et -2, OASIS et MFSD2	[65]
		Régule l'expression de la hCG	[65]
PRKA	BeWo	Régulation de la fusion	[61]
		Augmente l'activité de GCMA	[61]
		Stimule l'expression de la β hCG	[150]
Syncytine-1	BeWo	Méiateur de la fusion des trophoblastes	[61,65]
Syncytine-2	BeWo	Méiateur de la fusion des trophoblastes	[65]
β hCG (protéine)	BeWo	Stimule la fusion des trophoblastes	[65,150]

Légende :

AP-2 : *Activating protein-2*; ATF-1 : *Activating transcription factor-1*; CREB : *cAMP responsive element binding protein*; Cx43 : *connexin-43*; MAPK3/1 : *Extracellular signal-regulated kinase*; GCMA : *Glial cell missing factor α* ; hCG : hormone gonadotrope chorionique; MFSD2 : *Major facilitator superfamily domain containing 2*; OASIS : *Old astrocyte specifically induced substance*; PRKA : protéine kinase A.

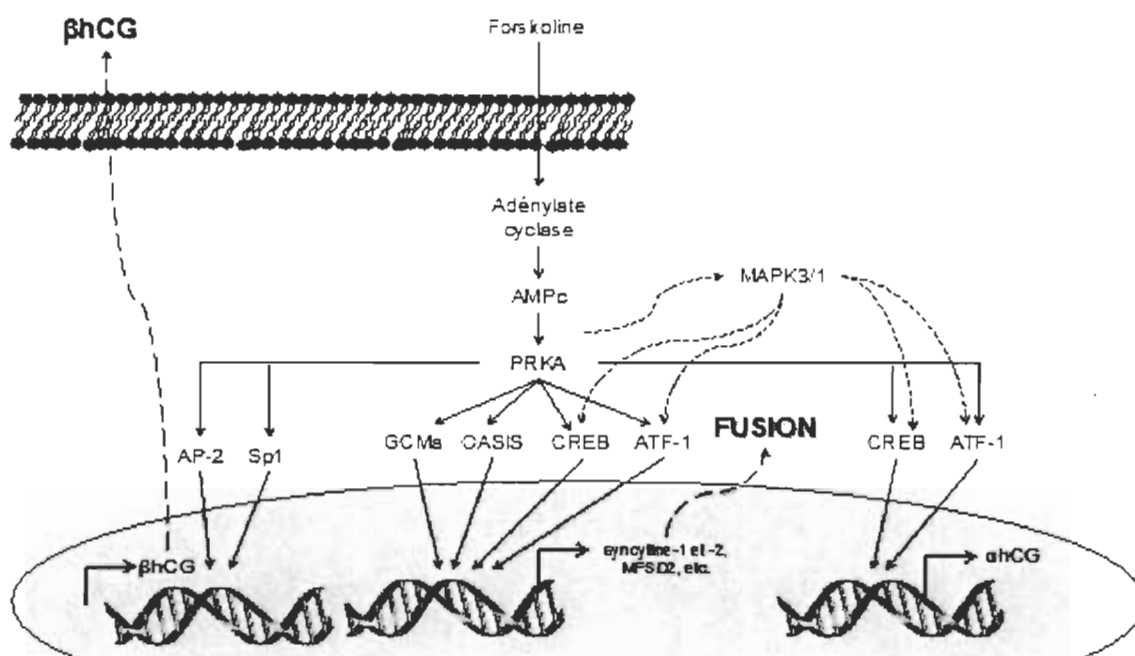


Figure 1.9 : Modèle moléculaire de la différenciation des cellules BeWo en réponse à la forskoline.

La forskoline génère une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc activant la PRKA. Cette kinase procède à l'activation de divers facteurs de transcription régulant l'expression de gènes liés à la fusion et augmentant l'expression des deux sous-unités de la hCG. La voie MAPK3/1 MAP kinase peut aussi être activée via la voie AMPc/PRKA. La première voie peut participer à l'activation de facteurs de transcription permise par la seconde.

L'activation de ces trois voies en réponse à la forskoline augmente l'activité de différents facteurs de transcription impliqués dans l'expression de gènes et de protéines clés de la fusion des CT. Ainsi, tel qu'indiqué dans le tableau 1.1, la PRKA stimule l'activité de transcription de *Glial cell missing a* (GCMa) [68] dont l'implication est reconnue dans le phénomène de fusion des CT [68, 162, 163]. Les gènes dont l'expression est induite par GCMa sont entre autres des acteurs clés du processus de fusion cellulaire. Ainsi, la transcription des gènes correspondant aux protéines membranaires syncytine-1 et -2 de même qu'au récepteur de la syncytine-2, *Major facilitator superfamily domain containing protein 2* (MFSD2), repose sur l'activité de GCMa [68]. Par ailleurs, la PRKA permet aussi la phosphorylation des facteurs de transcription *Old astrocyte specifically induced substance* (OASIS) et *cAMP response*

element binding protein (CREB) qui participent aussi à la transcription de GCMA [65, 163], stimulant davantage la fusion des CT. Puisque la voie AMPc/PRKA peut activer la voie MAPK3/1 MAP kinase et que la seconde voie peut aussi induire l'activation de CREB et l'expression de la syncytine-1 [65], ces deux voies de signalisation convergent vers la stimulation de la fusion syncytiale qu'elles régulent de manière commune (voir figure 1.9). Ainsi, MAPK3/1 peut potentialiser l'effet de la PRKA sur cet aspect de la différenciation des CT.

Enfin, l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc causée par un traitement à la forskoline est liée à la sécrétion de hCG [160] et, plus précisément, à l'expression des deux sous-unités de l'hormone (α hCG et β hCG) [161]. Bien que les régions promotrices des gènes de ces deux sous-unités comportent des éléments de réponse à l'AMPc, leur expression est régulée par deux groupes différents de facteurs de transcription. D'un côté, dans le cas de la sous-unité α , la dépendance à l'AMPc est soulignée par la présence d'une région de type *cAMP responsive element* (CRE) au sein du promoteur chez les cellules BeWo [164]. Alors que d'autres régions agissent conjointement avec celle-ci, la délétion de la région CRE réduit l'activité du promoteur de manière significative, soulignant donc que cet élément est un régulateur principal de l'expression de la sous-unité α [164]. Des résultats similaires ont été obtenus chez une culture primaire de CT, démontrant encore une fois l'importance de la séquence CRE au sein du promoteur de ce gène [161]. Les facteurs de transcription CREB et *Activating transcription factor-1* (ATF-1), activés par la PRKA, se fixent à cette séquence et agissent à titre de régulateur de l'expression de la α hCG [161]. D'un autre côté, dans le cas de la sous-unité β , la région promotrice (-311 à -188) des six gènes indépendants (β hCG 5, 8, 7, 3, 2 et 1) codant cette sous-unité comporte des sites où se fixent de multiples facteurs de transcription agissant de façon coopérative [50, 165]. De manière plus précise, la séquence comprise entre -311 et -279 maintient l'expression basale de la β hCG alors qu'une région plus étendue (-311 à -202) contient de multiples éléments de réponse à l'AMPc et permet d'induire une activité de transcription plus importante [165, 166]. Albanese *et al.* [166] ont démontré que CREB ne fait pas partie des facteurs de transcription se fixant à ces éléments de réponse au sein du promoteur de la β hCG et,

donc, que CREB est probablement inefficace dans l'activation de la transcription de cette sous-unité. Cependant, les facteurs de transcription *activating protein-2* (AP-2) et *specificity protein 1* (Sp1), aussi activés par la PRKA, sont tous deux connus pour s'associer avec les régions promotrices du groupe de gènes de la β hCG [165]. Or, Sp1 semble essentiel à la maintenance de l'expression basale de la β hCG alors que AP-2 apparaît induire la transcription des gènes de l'hormone en réponse à l'augmentation du taux d'AMPC intracellulaire [165]. En bref, la voie AMPC/PRKA est impliquée dans la différenciation biochimique des CT, mais cette voie régule la sécrétion de la hCG de manière différentielle en regard des deux sous-unités de cette hormone. Contrairement à son action sur la différenciation morphologique, la voie MAPK3/1 MAP kinase apparaît peu apte à stimuler la sécrétion de la hCG, plus précisément de la sous-unité β . En fait, puisque MAPK3/1 permet d'amplifier l'effet stimulant de la forskoline quant à l'activation de CREB [65], la kinase ne peut que stimuler davantage la transcription de la sous-unité α , CREB ne se fixant pas au promoteur de la β hCG [166]. À la lumière de ces observations, le modèle généralement accepté quant au mécanisme moléculaire de la différenciation des cellules BeWo en ST sous l'action de la forskoline est présenté à la figure 1.9.

De manière générale, la fusion des CT et des modèles comme les cellules BeWo est déterminée par la diminution de l'expression de protéines membranaires telles la desmoplakine, la cytokératine-7 ou la E-cad [45, 62, 160, 167]. La dernière protéine, plus particulièrement, a été associée aux interactions cellules-cellules préalables à la fusion des CT [45]. En effet, il apparaît que son expression est augmentée lors de l'agrégation des CT, puis diminue en parallèle à la fusion. D'ailleurs, la E-cad semble essentielle à ce processus, la formation du syncytium étant compromise suite à l'immunoneutralisation de la E-cad [45]. La différenciation biochimique est quant à elle déterminée par le dosage d'hormones telles la hCG et la hPL par *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), le dosage de la hCG étant utilisé de manière courante [51, 168]. Le simple dosage de la hCG était, par le passé, souvent utilisé comme seul déterminant de la différenciation des trophoblastes en raison de sa corrélation à la fusion [167]. Cependant, plusieurs études tendent à démontrer l'absence de corrélation entre les

deux axes de la différenciation qui semblent plutôt être régulés par des mécanismes moléculaires différents et seulement en partie communs [150].

1.5 Hypothèses de travail et objectifs

Les ST jouent un rôle critique durant l'ensemble de la grossesse en raison des intenses processus d'échanges foetomaternels s'y déroulant. La formation des ST est hautement dépendante d'un complexe processus de différenciation terminale des CTV [7, 151] impliquant la fusion de leurs membranes plasmiques et l'acquisition de fonctions endocrines, notamment la capacité à produire et sécréter la hCG [7]. Toutefois, les mécanismes et les acteurs moléculaires impliqués dans la fusion des CTV, étape limitant la formation et le maintien des ST, ne sont que peu connus. *In vitro*, par exemple, le simple ajout de sérum foetal bovin à une culture primaire de CT est suffisant pour stimuler ces cellules à fusionner de manière spontanée [62, 151] sans qu'un facteur précis n'ait été identifié à titre d'inducteur clé de ce processus. Il a cependant été établi que la fusion est associée à une augmentation concomitante du taux intracellulaire d'AMPc [160] et qu'un traitement avec ce facteur ou un analogue soit efficace afin d'induire la fusion cellulaire de modèles de CT dérivés de choriocarcinomes [151]. Plus encore, il apparaît que ce second messager soit aussi un stimulant de l'expression et de la sécrétion de la hCG [166]. Certaines cytokines peuvent aussi agir à titre de régulateurs autocrines ou paracrines de la différenciation des CT, dont le LIF [7]. Cette cytokine est connue pour son rôle dans l'optimisation de la réceptivité endométriale nécessaire à l'implantation embryonnaire [12], mais son action sur la différenciation des CT semble plus mitigée. Proposé à la fois comme stimulant et répresseur de la sécrétion de la hCG [19, 20], son effet sur la fusion cellulaire n'est pas répertorié. Diverses évidences suggèrent toutefois que le LIF pourrait agir comme modulateur de la différenciation des CT en ST [17, 18]. L'aptitude de la cytokine à activer certaines voies de signalisation intracellulaire jouant un rôle dans la placentation soutient aussi cette hypothèse. En effet, le LIF agit comme activateur de la voie MAPK3/1 MAP kinase dont le rôle dans la fusion de cultures primaires de CT ou des cellules BeWo et la sécrétion de la hCG est répertorié dans la littérature [62, 65]. De plus, la voie JAK/STAT, surtout le facteur de

transcription STAT3, est activée en réponse au LIF [101, 130]. Des évidences provenant d'études menées chez la souris tendent à indiquer que cette voie pourrait être un acteur important de la formation du placenta et, potentiellement, de la différenciation des CT en ST [105]. En regard de ces observations, nos hypothèses de travail sont les suivantes :

1. Le LIF agit à titre de régulateur négatif de la différenciation biochimique, c'est-à-dire qu'il réduit la capacité des cellules BeWo à sécréter la hCG au cours de leur différenciation induite par la forskoline. Cette action serait imputable à l'activation des voies JAK/STAT et MAPK3/1 MAP kinase.
2. L'acquisition des fonctions endocrines se faisant de manière subséquente à la fusion cellulaire [31], le LIF est susceptible d'inhiber la fusion des cellules BeWo lors de leur différenciation induite par la forskoline. Cette fois encore, la modulation des deux processus, fusion et sécrétion de hCG, passerait par l'activation des voies JAK/STAT et MAPK3/1 MAP kinase.

En lien avec ces hypothèses, l'objectif général de ce projet est de déterminer l'effet biologique du LIF sur chacun des axes de la différenciation des cellules BeWo lors de l'induction du processus via un traitement avec la forskoline. La voie JAK/STAT est connue pour être activée en réponse au LIF au niveau de divers modèles de cellules trophoblastiques, notamment la lignée JEG-3 et HTR-8/SVneo [101, 131]. Cependant, aucune information n'est disponible chez le modèle BeWo. De même, le LIF entraîne l'activation de la voie MAPK3/1 MAP kinase chez plusieurs types de cellules, dont les neurones et les cellules trophoblastiques HTR-8/SVneo [131, 134], mais, cette fois encore, aucune information n'est disponible par rapport aux cellules BeWo. Ainsi, le premier objectif spécifique du projet vise à déterminer la capacité du LIF à activer ces deux voies de signalisation chez les cellules BeWo. En vue d'élucider le mécanisme par lequel le LIF module la différenciation morphologique et biochimique du modèle cellulaire utilisé, le second objectif spécifique vise à évaluer la participation respective des voies JAK/STAT et MAPK3/1 MAP kinase à l'effet biologique du LIF sur la fusion cellulaire et la sécrétion de la hCG induite par la forskoline.

Ce projet représente la seule étude décrivant le rôle régulateur du LIF quant à l'acquisition des capacités de fusion des cellules BeWo de même que le mécanisme moléculaire général lié à cet effet. Ce projet décrit aussi l'effet du LIF sur les fonctions endocrines des trophoblastes au cours de leur différenciation et y démontre l'implication jusqu'ici peu connue de la voie JAK/STAT. L'importance et l'intérêt de tels travaux s'inscrivent dans la perspective d'une meilleure compréhension des processus sous-jacents à la différenciation des CT en ST dans un contexte normal afin de mieux comprendre les sources des dysfonctions liées à ce processus complexe. Il serait alors possible de prévenir les complications gestationnelles découlant d'une insuffisance placentaire, notamment la restriction de la croissance intrautérine ou la mort fœtale intrautérine, auxquels sont prédisposées des grossesses affectées par la trisomie-21 [53, 169].

CHAPITRE II

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Ce chapitre est présenté sous forme d'article, en anglais, et a été publié dans le journal *Biology of Reproduction* sous la référence :

Leduc K, Bourassa V, Asselin E, Leclerc P, Lafond J, Reyes-Moreno C, Leukemia Inhibitory Factor Regulates Differentiation of Trophoblast-Like BeWo Cells Through the Activation of JAK/STAT and MAPK3/1 MAP Kinase-Signaling Pathways. Biol Reprod, published 2 November 2011; DOI 10.1095/biolreprod.111.094334

2.1 Contribution des auteurs

L'ensemble des expérimentations à la base de cet article a été effectué par Katy Leduc. Vincent Bourassa a contribué à la réalisation des expérimentations entourant les essais de signalisation cellulaire. Le design expérimental a été fait par Katy Leduc et Carlos Reyes-Moreno. Le manuscrit a été rédigé en entier par Katy Leduc, à laquelle rédaction a collaboré Vincent Bourassa. Le manuscrit a été révisé et corrigé par les Drs Carlos Reyes-Moreno, Éric Asselin, Julie Lafond et Pierre Leclerc.

2.2 Résumé

Il est bien établi que la formation du syncytium implique à la fois la fusion des trophoblastes mononucléés en vue de former une structure multinucléée et l'augmentation de l'expression de facteurs hormonaux comme la hCG. Ces changements morphologiques et biochimiques sont sous l'influence d'une multitude de facteurs qui engendrent l'activation de plusieurs voies de signalisation à l'interface foeto-maternelle, telles les voies JAK/STAT et MAPK3/1 MAP kinase. Nous avons utilisé à titre de modèle de syncytialisation induit par la forskoline les cellules dérivées de choriocarcinome BeWo afin de caractériser les effets du LIF au niveau de la

différenciation des trophoblastes et pour décrire son action d'un point de vue moléculaire. Nos résultats démontrent que le LIF n'a aucun effet chez les cellules non différenciées et que la cytokine provoque une forte réduction de la production de hCG induite par la forskoline. De manière opposée à la sécrétion de hCG, le LIF potentialise l'effet de la forskoline au niveau de la fusion. La production hormonale est altérée par le LIF dépendamment de l'activation de la voie JAK/STAT alors que MAPK3/1 kinase n'est pas impliquée. Toutefois, les deux voies sont requises afin d'induire l'effet du LIF en regard de la fusion cellulaire. Ces résultats fournissent de nouvelles pistes quant à la régulation de la différenciation des cellules BeWo et décrivent pour la première fois le mécanisme moléculaire inhérent à l'effet du LIF.

2.3 Article scientifique

Leukemia Inhibitory Factor Regulates Trophoblast-like BeWo Cells Differentiation Through the Activation of JAK/STAT and MAPK3/1 MAP Kinase Signaling Pathways*

Katy Leduc¹, Vincent Bourassa¹, Éric Asselin¹⁻², Pierre Leclerc³, Julie Lafond²⁻⁴ and Carlos Reyes-Moreno^{1-2§}

¹*Groupe de Recherche en Oncologie et Endocrinologie Moléculaires, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC, G9A 5H7, Canada*

²*Centre de recherche BioMed, Montréal, QC, H3C 3P8, Canada*

³*Centre de recherche du CHUL-CHUQ, Université Laval, Québec, QC, G1V 4G2, Canada*

⁴*Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, H3C 3P8, Canada*

§To whom correspondence should be addressed:

Université du Québec à Trois-Rivières,

Dépt. Chimie-biologie,

3351 boul. des Forges, C.P. 500

Trois-Rivières, QC

G9A 5H7, Canada

Tel. : (1)-819-376-5011, ext.3308

Fax : (1)-819-376-5084

E-mail : carlos.reyes-moreno@uqtr.ca

*This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Réseau Québécois en Reproduction (RQR) to CRM. KL was supported by the Fonds Québécois de la Recherche sur la

Nature et les Technologies (FQRNT). VB was supported by the Undergraduate Student Research Awards Program of the NSERC.

Short title : LIF regulation of trophoblast-like BeWo cell differentiation

Summary : Leukemia inhibitory factor reduces forskolin-induced hCG secretion through the activation of JAK/STAT signaling pathway while enhancing forskolin-induced syncytial fusion by the activation of both JAK/STAT and MAPK3/1 MAP kinase signaling pathways in BeWo cells.

Keywords: hCG / implantation / trophoblast / leukemia inhibitory factor / human

ABSTRACT

It is well established that syncytium formation involves the fusion of mononucleated trophoblasts into a multinucleated structure and the secretion of hormonal factors such as the human chorionic gonadotrophin (hCG). These morphological and biochemical changes are regulated by a plethora of ligands which, upon binding to specific receptors, triggers the activation of many signaling pathways such as janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) and the mitogen-activated protein (MAP) kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (MAPK3/1). We used the forskolin-induced syncytialization of trophoblast-like BeWo cells to characterize at the cellular level, the effect mediated by leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation and to describe its action at the molecular level. Forskolin induces both hCG secretion and BeWo cell syncytial fusion. While LIF had no effect on the undifferentiated state of the cells, the cytokine generate a strong reduction in forskolin-induced hCG release. In contrast to its effect on hCG secretion, LIF exerts a synergistic effect toward forskolin-induced fusion. LIF reduced hormonal production through a STAT1- and STAT3-dependent mechanism whereas MAPK3/1 was not involved in this process. However, both types of signaling molecules were required to mediate the action of LIF in forskolin-induced cell fusion. This data provides novel insights into the regulation of trophoblast cell differentiation by LIF and describes for the first time the molecular mechanism underlying the effect of the cytokine.

INTRODUCTION

Successful embryo implantation is dependent upon a tightly regulated molecular cross-talk between the embryonic trophoblast cells and the maternal decidua in order to attach the placenta to the uterine wall, to generate feto-placental vasculature, and to allow maternal immune tolerance of the fetal semi-allograft [1, 2]. One of the key cytokines essential for successful implantation is leukaemia inhibitory factor (LIF) [3-5], a member of the interleukin (IL)-6 cytokine family [6] that display multiple functions in various tissues and organs [5, 7]. Strong evidence for the important role of LIF in implantation comes from the fact that blastocyst fails to attach to the uterus in LIF knockout mice [8]. In fertile women, high uterine LIF expression is a positive indicator of uterine receptivity to the implanting blastocysts, whereas low levels or the absence of functional LIF leads to reduced fertility [4, 9, 10]. Involvement of LIF in the invasive capacities of extravillous trophoblasts has been described previously [11-13], although its importance might not be exclusive to implantation as it might also be involved in further stages of pregnancy such as the placentation process. This latter effect possibly occurs through a paracrine interaction between uterine LIF and its receptor in extra-embryonic trophoblast cell lineages. In one hand, it was established that LIF is highly expressed in decidual NK cells and macrophages during pregnancy [14], but low levels was observed in first trimester decidua and in the chorionic villous [15, 16]. On the other hand, the expression levels of LIF receptor subunit β (LIF-R β) is significantly higher in both villous and extravillous trophoblast than in decidua [14-16]. These studies indicate that LIF is produced from both the decidua and the chorionic villi and identify all cells of the trophoblast lineage as the main targets for the action of LIF in human placenta. However, the role of LIF in the priming of trophoblasts cells to undergo differentiation toward multinucleate hormone producing cells of the syncytiotrophoblast remains unclear.

At the molecular level, LIF acts on cells by inducing the heterodimerization of LIF receptor subunits LIFR and glycoprotein 130 (IL6ST) which, upon binding, leads to the phosphorylation and thereby activation of janus kinase 1 and 2 (JAK1 and JAK2) and signal transducer and activator of transcription 1 and 3 (STAT1 and STAT3) [6, 7]. The

cytokine also activates other signaling pathways such as those involving the mitogen-activated protein (MAP) kinases and phosphatidylinositol-3-kinase (PIK3)/AKT [6, 7], the degree to which these signaling pathways are activated being cell-type dependent. Because of their roles in trophoblast differentiation, STAT3 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (MAPK3/1) MAP kinase are particularly interesting factors. STAT3 is involved in the acquisition of invasive capacities of primary trophoblasts or trophoblast-like cell lines [3, 11-13], and MAPK3/1 modulates both fusion and hCG secretion in primary syncytiotrophoblasts and trophoblast-like BeWo cells [17, 18]. As a pregnancy-associated cytokine, LIF is known to activate the JAK/STAT signaling pathway mainly via the phosphorylation of STAT3 [3, 11-13] but little is known about STAT1 or MAPK3/1 MAP kinase activation during this process. In fact, no data is yet available about the interplay between LIF, STAT1 and MAPK3/1 activation, and trophoblast differentiation, which prompted us to investigate the role of these signaling molecules in a model of trophoblast cells.

Human choriocarcinoma BeWo cell is the most extensively used cellular *in vitro* model to study villous trophoblast fusion [19]. This cell line was established from cells derived from first trimester trophoblast. Undifferentiated BeWo cells are morphologically similar to primary cultures of cytotrophoblasts, exhibiting close cell apposition and microvillar projections on the apical side of the monolayer [20]. In contrast with primary cultures of cytotrophoblasts, which lack their proliferative capacity but preserve their spontaneous fusogenic activity [21, 22], BeWo cells show a low spontaneous fusion rate, which can be boosted upon treatment with cyclic-adenosine monophosphate (cAMP) or forskolin [21]. Forskolin-stimulated BeWo cells also demonstrate hormonal secretion properties common to typical trophoblasts and express markers of syncytiotrophoblast such as β -hCG, syncytin, and markedly decreased E-cadherin expression [22-25]. The similarities between BeWo cells and trophoblasts support the use of these cells as valid and suitable model to study different aspects of trophoblast differentiation. Thus, using BeWo cell as a trophoblast model, the aim of this work was to investigate the effect of LIF in cytotrophoblasts differentiation to syncytiotrophoblasts and to describe its mechanism of action at the molecular level. The activation of JAK/STAT and MAPK3/1

signaling pathways was evaluated in response to LIF during the course of forskolin-induced BeWo cell differentiation. Using pharmacological inhibitors, we pointed out how LIF could molecularly regulate this process by determining the inhibitory action of STAT1 and STAT3 in β hCG secretion and its stimulatory role in cell fusion; MAPK3/1, however, was found to be implicated only in enhancing syncytial fusion. Moreover, our data suggests that biochemical and morphological differentiation might evolve in distinct manners and exposes for the first time the regulatory molecular mechanism of LIF in BeWo cell differentiation.

MATERIALS AND METHODS

Material

All cell culture media, serum and cell culture reagents were purchased from Wisent (St-Bruno, QC, CAN). Cell culture plates and flasks were from Corning (Corning, NY, USA). The cytokine LIF was from Millipore (Toronto, ON, CAN). The chemicals dimethyl sulfoxide (DMSO), forskolin, methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) and Hoechst 33258 dye and all electrophoresis grade chemicals were from Sigma Chemical Company (Oakville, ON, CAN). Cocktails of proteases and phosphatases inhibitors were from Roche Applied Science (Quebec, PQ, Canada). The specific inhibitor of janus kinases (JAK1, JAK2, JAK3 and TYK2), JAK inhibitor I, was from Calbiochem (San Diego, CA, USA) and the MAP kinase MAPK3/1 signaling pathway inhibitor PD98059 was from Cell Signaling Technologies (Pickering, ON, CAN). The rabbit polyclonal antibodies against phospho-STAT1 (pY701), STAT-1, phospho-STAT3 (pY705), STAT-3, phospho-MAPK3/1 (pT180/pY182) and MAPK3/1 were purchased from Cell Signaling Technologies whereas monoclonal peroxidase-conjugated mouse anti- β -actin antibody was purchased from Sigma Chemical Company and the horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG came from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON, CAN). For the studies of E-cadherin expression, mouse anti-E-cadherin antibody, a kind gift of Dr Monique Cadrin (Université du Québec à Trois-Rivières), came from BD Bioscience (Mississauga, ON, CAN) and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG was purchased from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). The beta form of human chorionic gonadotrophin (β hCG) ELISA kit was purchased from DRG International Inc (NJ, USA).

Cell culture

Human placental choriocarcinoma BeWo cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Cells were maintained as monolayers in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C and were grown in RPMI-1640 cell culture media supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1 mM

sodium pyruvate, 10 mM HEPES and 50 µg/ml gentamicin. Cell culture was split every 2 to 3 days and culture medium was changed every 2 days. For sub-culturing, cells were removed by an enzymatic treatment (0,25% trypsin-EDTA, 37 °C, 5 min), harvested and sub-cultured in 175 cm² culture flask or plated for further experimental needs. To avoid any changes in cell behavior during the course of the study, the experiments using BeWo cells were restricted at relative early passage only, i.e. from passages 8 to 15.

Cell viability and proliferation assay

Cell viability was assessed by the MTT cell proliferation assay as previously described [26]. Briefly, cells were plated at a cell density of 7.5×10^3 cells/100µL/well in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS in a 96-well plate and incubated overnight. LIF (50 ng/ml), forskolin (10 µM), and a combination of LIF and forskolin was added for 48 h in RPMI-1640 containing 5% FBS. Stock solutions of LIF and forskolin were prepared in fresh serum-free culture media and DMSO, respectively. Control and LIF experiments were performed in parallel by treating the cells with an equal volume of DMSO. At the end of the culture period, 10 µl of 5 mg/ml MTT solution was added to each well. After a 3-h incubation period with MTT reagent, 100 µl of MTT solubilization buffer was added (10% SDS in 10 mM HCl) and plates were placed overnight in the cell incubator before absorbance measure. The optical density was read at 580 nm using the Microplate Reader Manager (from Bio-Rad Laboratories). Assay was performed in quadruplicates and represents three independent experiments.

Quantification of secreted β -human chorionic gonadotrophin (β hCG)

In order to evaluate the effect of LIF on forskolin-induced biochemical differentiation of BeWo cells, β hCG quantifications were assessed using β hCG ELISA kits as indicated by the manufacturer's instructions (DRG International Inc). Briefly, cells were plated in 24-well plates at a cell density of 4.5×10^4 cells/500 µL/well and incubated overnight in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS. DMSO as vehicle, 50 ng/ml LIF, 10 µM forskolin and a combination of LIF and forskolin was added for 48 h in RPMI-1640

containing 5% FBS. At the end of the treatments period, the media was collected, clarified by low-speed centrifugation (500 g) and kept at -20°C until β hCG quantification and fresh media was added to each well to evaluate cell viability/proliferation via MTT assays as described above. Assay was performed in triplicates and repeated three times.

Evaluation of E-cadherin expression by immunofluorescence and immunoblotting

Syncytial fusion depends on the expression of many surface glycoproteins like E-cadherin which is down regulated during syncytialization [22]. E-cadherin is a cell adhesion molecule expressed only at the membrane of the isolated cytotrophoblasts. During the process of differentiation of isolated trophoblast cells (as well as BeWo cells treated with forskolin), E-cadherin mRNA and protein are down-regulated in association with loss of E-cadherin staining at cell boundaries of fusing cells [22]. Thus, we assessed E-cadherin expression by immunofluorescence as an indirect and qualitative marker of trophoblast syncytialization as described elsewhere [27]. Briefly, cells were plated at a cell density of 2.0×10^5 cells/2 ml/well on coverslips in 6-well dishes and incubated at 37 °C in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS. The treatments with DMSO, LIF, forskolin, and a combination of LIF and forskolin were started the day after for 48 h in RPMI-1640 supplemented with 5% FBS. The cells were then washed twice with phosphate buffered saline (PBS), fixed with a mixture of ethanol and methanol (1:1) for 15 min at -20 °C, washed twice with PBS and incubated for 60 min with PBS containing 2 % FBS at room temperature to eliminate non-specific binding. Thereafter, cells were incubated with primary mouse anti-E-cadherin antibody (1/50 dilution in PBS+2% FBS) overnight at 4 °C, rinsed twice in PBS and incubated for 60 min with secondary FITC-coupled anti-mouse IgG (1/50 dilution in PBS + 2% FBS) at 4 °C in the dark. For nuclear staining, cells were washed twice with PBS, incubated 5 min with Hoescht 33258 dye (1/1000 dilution in PBS + 2% FBS) and rinsed twice with PBS and once with distilled water. Cells were then wet-mounted with Vectashield (Vectro Laboratories, Burlington, ON, CAN) and viewed using an Axio Observer inverted microscope (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, GER). All observations were

performed at 20X magnification on cell monolayers. Five fields were taken randomly for each different treatment. Representative (n=5) fields are shown. To quantify the effects of different treatments on syncytialization, the relative E-cadherin expression levels in BeWo cells were assessed by immunoblotting as previously described [28]. Briefly, protein samples of 50 µg were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto a PVDF membrane (Millipore). Blotted membranes were probed with a mouse anti-E-cadherin antibody diluted 1/500 in PBS containing 0.1% Tween20 (referred to as PBST) and 5% bovine serum albumin (BSA; from Sigma Chemical Company). As previously described [28], human β-actin expression was used as an internal control for semi-quantitative analysis of E-cadherin protein expression.

Immunodetection of LIF-induced signaling molecules

To evaluate the effect of LIF on intracellular pathways activation, cells were seeded in a 24-well plate at a cell density of 1.0×10^5 cells/500 µL/well in serum-free culture media and incubated overnight. Cells were then treated with 50 ng/ml LIF alone or in combination with 10 µM forskolin. Cell treatments were stopped after 5, 15 and 30 min of stimulation by adding pre-boiled (95°C) 2x SDS solubilisation buffer containing 1.25 mM Tris-Base pH 6.8, 4% SDS, 10% β-mercaptoethanol, 18% glycerol, 0.03% bromophenol blue, and 2% proteases and phosphatases inhibitors, as described [26, 29, 30]. Cell lysates were boiled for 10 min. Protein samples were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto a PVDF membrane. Blotted membranes were blocked for 60 min at room temperature in PBST containing 5% skim milk and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies against total or phosphorylated form of STAT1, STAT3 and MAPK3/1 proteins (1/1000 dilution) as well as human β-actin (1/40 000 dilution), as a loading control. All antibodies were diluted in PBST containing 5% BSA. Membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit-IgG, 1/3000 dilution in PBST-5% skim milk) for 60 min at room temperature and revealed by chemiluminescence detection using the Thermo SuperSignal system (Bio-Rad Laboratories). The blots were then treated with stripping solution (25 mM glycine, pH 2; 1% w/v SDS) for 60 min, blocked as described above,

washed three times with PBST and then probed with another primary antibody. The most representative result from three independent experiments is shown.

Inhibition of LIF-induced signaling pathways activation during forskolin-induced BeWo cell differentiation

Cells were plated as described above and preincubated for 60 min with either vehicle alone (DMSO), the JAKs inhibitor JAK inhibitor I (5 μ M; optimal dose) or the MAPK3/1 inhibitor PD98059 (50 μ M; optimal dose). Cells were washed twice, cultured in serum-free culture media and stimulated with DMSO, and LIF alone or in combination with 10 μ M forskolin. To observe the effect of JAKs and MAPK3/1 inhibitors on LIF-induced signaling pathways activation, pretreated cells were stimulated for 15 min and cell lysates were prepared and analyzed by immunoblotting as described above [26, 29, 30]. To evaluate the effect of LIF-induced signaling pathways inhibition on forskolin-induced *biochemical and morphological* differentiation of BeWo cells, pretreated cells were stimulated for 48 h and prepared for β hCG quantifications and E-cadherin expression analysis by immunofluorescence and immunoblotting as described above. All treatments of cultured cells with chemical inhibitors, forskolin, and LIF were performed in RPMI-1640 containing 5 % FBS.

Statistical analyses

Values were presented as mean \pm SD from at least three independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferonni post-test using Prism software, version 3.03 (GraphPad, San Diego, CA). p values of ≤ 0.05 were considered to indicate statistical significance.

RESULTS

Effect of LIF on forskolin-induced BeWo cell differentiation

Cytotrophoblasts differentiation to syncytiotrophoblasts is associated with specific and measurable features such as enhanced β hCG secretion, defined as biochemical differentiation, and cell fusion, defined as morphological differentiation [31]. In BeWo cells, these processes can be mimicked by forskolin, known to enhance intracellular cAMP concentration through the activation of adenylyl cyclase [18, 32], activating therefore downstream effectors like protein kinase A (PRKA). Since PRKA activation has been linked to the induction of β hCG secretion [18, 33] as well as fusogenic activity [34], forskolin would promote trophoblast differentiation into syncytiotrophoblast-like cells through the cAMP-dependent pathway. We sought to investigate how LIF could influence the progression of forskolin-induced BeWo cell differentiation by evaluating its effect on both axes of the process. We have established that forskolin does not change the proliferation rate of BeWo cells at the concentration of either 1 μ M (Relative cell number: $105\% \pm 6\%$ of control), 10 μ M (Relative cell number: $99\% \pm 12\%$ of control), or 50 μ M (Relative cell number: $106\% \pm 6\%$ of control). In contrast to cell proliferation, BeWo cell β hCG secretion proportionally enhance in the presence of increasing doses of forskolin, the basal level of 85 ± 15 ng/ml reaching a level of 124 ± 34 ng/ml at 1 μ M, 369 ± 106 ng/ml at 10 μ M, and 552 ± 36 ng/ml at 50 μ M.

We next examined by MTT assays the changes in the relative number of viable cells in BeWo cell cultures treated for 48 h with LIF alone or in combination with forskolin. We found no significant effect on BeWo cell proliferation due to LIF at 50 ng/ml, alone or in combination with 10 μ M forskolin. The relative number of viable cells, expressed as percent of control, was determined at $97\% \pm 6\%$ with LIF at 50 ng/ml, at $100\% \pm 10\%$ with forskolin at 10 μ M, and at $99\% \pm 10\%$ in combination of LIF with forskolin. Trypan blue counts have confirmed that cell viability is not affected for all treatments as compared with untreated BeWo cells (data not shown).

Next, β hCG expression was quantified in order to investigate if LIF is operative in regulating forskolin-induced biochemical differentiation of BeWo cells. Given that β hCG dosage could be dependent on the number of viable cells in each independent measure, hormone concentration was expressed as β hCG secretion normalized with relative cell number, as determined by the absorbance measures from MTT viability/proliferation assays. As shown in figure 1A, the cytokine, when used alone, had no effect on β hCG secretion by BeWo cells. In contrast to LIF, however, forskolin alone enhance significantly β hCG secretion when compared with untreated cells (from 80 ± 44 ng/ml to 455 ± 57 ng/ml). Unexpectedly, LIF (at 50 ng/ml) exerts a strong inhibitory effect on forskolin-induced β hCG secretion, reducing hormonal production by $65\% \pm 10\%$ (from 455 ± 57 ng/ml to 161 ± 44 ng/ml).

We have determined that syncytialization of BeWo cells is efficiently induced by forskolin, as the expression of E-cadherin is substantially decreased in the presence of forskolin at 10 μ M (Fig. 1B and 1C). A second major change induced by forskolin treatment is the dispersion of BeWo cells, which in fact are growing in tight clusters of cells in the absence of forskolin (Fig. 1B). To examine if LIF is effective in regulating forskolin-induced morphological differentiation of BeWo cells, cell fusion was then evaluated through reduction or augmentation of E-cadherin expression. The most important effects were observed after 48 h exposure to LIF at 50 ng/ml and are presented in figure 1. As can be seen in figure 1B, control (DMSO-treated) BeWo cells show strong E-cadherin staining at cell surface membrane boundaries, whereas a treatment with 10 μ M forskolin results in reduced expression of the protein at cell-cell contact areas. When challenged with 50 ng/ml LIF alone for 48 h, BeWo cells exhibits a level of E-cadherin expression similar to control cells. Surprisingly, cells treated with forskolin and LIF express less E-cadherin than when treated with forskolin alone (Fig. 1B). Western blot analysis (Fig. 1C) with anti-E-cadherin antibody have confirmed that LIF exerts a synergistic effect on forskolin-induced cell fusion, as BeWo cell E-cadherin expression (expressed as E-cadherin/ β -actin ratio) is reduced by $40\% \pm 5\%$ in the presence of forskolin (from 1.4 ± 0.2 to 0.9 ± 0.1) and by $70\% \pm 7\%$ in the presence of forskolin and LIF (from 1.4 ± 0.2 to 0.5 ± 0.1).

Activation of JAK/STAT and MAPK3/1 signaling pathways by LIF alone or in combination with forskolin

Figure 2A shows representative activation status of STAT1, STAT3 and MAPK3/1 following treatments with DMSO (control), 10 μ M forskolin, and 50 ng/ml LIF alone or in combination with 10 μ M forskolin. Very little or no variation in β -actin expression were observed, irrespective of the treatment of forskolin and LIF used alone or in combination with forskolin. Results were expressed as fold induction of control relative to the ratio phosphorylation-activated protein to β -actin protein (as internal control), and presented as mean \pm SD from three independent experiments in figure 2B.

Forskolin does not induce the phosphorylation of STAT1 or STAT3 at the concentration used in these experiments (10 μ M) but it transiently stimulates MAPK3/1 phosphorylation (Fig. 2A). As shown in figure 2B, this effect is observed at 15-min post-stimulation (1.7 ± 0.2 fold induction) and disappears after a 30-min stimulation period (1.2 ± 0.1 fold induction).

BeWo cells stimulation with LIF alone or combined with forskolin evoked a time-dependent tyrosine-phosphorylation of STAT1, STAT3, and dual phosphorylation (threonine and tyrosine) of MAPK3/1 (Fig. 2A). For STAT1, the values of fold induction were 3.4 ± 0.3 and 3.2 ± 0.2 at 15-min post-stimulation with LIF and LIF+FK, respectively; this effect was transient and decline after a 30-min stimulation period (Fig. 2B). For STAT3, the maximal effect was observed with LIF at 5 min and 15 min post-stimulation, the values of fold induction being 5.0 ± 0.4 and 4.9 ± 0.5 , respectively; similar STAT3 activation levels were detected at 5 min and 15-min post-stimulation with LIF+FK, the values of fold induction being 4.7 ± 0.5 and 4.3 ± 0.4 , respectively. STAT3 activation was lower but sustained after 30 min post-stimulation and the effect is missing after a 60-min post-stimulation period (Fig. 2B). For MAPK3/1, in the presence of LIF and LIF+FK the values of fold induction were 4.0 ± 0.4 and 4.3 ± 0.5 at 5-min post-stimulation, respectively, and 2.7 ± 0.2 and 2.4 ± 0.3 at 15-min post-stimulation, respectively; these effects were sustained even after a 60-min post-stimulation period

(Fig. 2A). Of note, at the dose used in these studies, forskolin shows slight or no effect on LIF-induced activation of STAT1, STAT3, and MAPK3/1 (Fig. 2A and 2B).

Divergent effects of LIF on β hCG secretion and cell fusion is mediated by JAK/STAT but not by MAPK3/1 signaling pathway

Once we have established that both JAK/STAT and MAPK3/1 pathways are activated in response to LIF, we next sought to determine how these pathways could modulate trophoblast differentiation and then hCG secretion and cell fusion. Specific cell signaling inhibitors were used to verify if LIF-induced activation of one or both pathways could account for the divergent effect of this cytokine on β hCG secretion and cell fusion. BeWo cells were pretreated for 60 min with either DMSO (vehicle), JAK inhibitor I, or PD98059. At the end of the pre-incubation period with vehicle and chemical inhibitors, cells were stimulated for 15 min with forskolin alone at 10 μ M and LIF at 50 ng/ml in the absence or the presence of forskolin. We have established that the inhibition of STAT-phosphorylation is achieved efficiently when cells are treated with 5 μ M JAK inhibitor I prior to stimulation with LIF or LIF combined with forskolin. PD98059 was highly efficient to block MAPK3/1 activation at 50 μ M. BeWo cell viability remains unchanged when treated with either JAK inhibitor I at 5 μ M or PD98059 at 50 μ M. Figure 3A shows representative immunoblot studies of LIF-induced signaling molecules in BeWo cells pretreated with JAK inhibitor I (5 μ M) and PD98059 (50 μ M). Results were expressed as relative phosphorylation-activated protein level compared to no phosphorylated protein expression level (as control), and presented as mean \pm SD from three independent experiments in figure 3B.

The pSTAT1/STAT1 ratio was evaluated at 0.5 ± 0.1 , 3.0 ± 0.4 , 0.5 ± 0.2 and 2.9 ± 0.4 in control cells, and in cells treated with LIF alone, LIF+JAK Inh I, and LIF+PD98059, respectively. In the presence of forskolin, the pSTAT1/STAT1 ratio was 0.4 ± 0.1 , 3.2 ± 0.4 , 0.4 ± 0.1 and 3.3 ± 0.3 (Fig. 3B). The pSTAT3/STAT3 ratio was evaluated at 0.6 ± 0.2 , 7.2 ± 0.5 , 3.1 ± 0.4 and 7.4 ± 0.6 in control cells, and in cells treated with LIF alone, LIF+JAK Inh I, and LIF+PD98059, respectively. In the presence of forskolin, the

pSTAT3/STAT3 ratio was 0.5 ± 0.2 , 8.6 ± 0.6 , 3.8 ± 0.4 and 6.9 ± 0.5 . These results demonstrated that JAK inhibitor I block more efficiently STAT1 rather than STAT3 activation, completely inhibiting STAT1 while the inhibition extent for STAT3 being $59\% \pm 8\%$ and $56\% \pm 7\%$ for LIF alone and LIF+forskolin, respectively. Moreover, the pSTAT1/STAT1 ratio and the pSTAT3/STAT3 ratio were not affected by the MAPK3/1 inhibitor PD98059 (Fig. 3B). The pMAPK3/1/(MAPK3/1) ratio was evaluated at 0.5 ± 0.1 , 5.1 ± 0.4 , 5.7 ± 0.6 and 2.8 ± 0.3 in control cells, and in cells treated with LIF alone, LIF+JAK Inh I, and LIF+PD98059, respectively (Fig. 3B). In the presence of forskolin, the pMAPK3/1/(MAPK3/1) ratio was 1.6 ± 0.2 , 7.3 ± 0.6 , 6.7 ± 0.8 and 3.2 ± 0.4 . Of note, while forskolin alone substantially increase pMAPK3/1/(MAPK3/1) ratio, PD98059 inhibition extent for MAPK3/1 activation induced by LIF and LIF+forskolin were evaluated at $47\% \pm 6\%$ and $56\% \pm 6\%$, respectively. The pMAPK3/1/(MAPK3/1) ratio was unaffected in the presence of JAK inhibitor I (Fig. 3B).

In further experiments, BeWo cells were pretreated with 5 μ M JAK inhibitor I or 50 μ M PD98059, and then β hCG secretion as well as E-cadherin expression (cell fusion) were evaluated following a 48-h treatment period with forskolin at 10 μ M alone or in combination with 50 ng/ml LIF. As shown above (Fig. 2), forskolin enhanced β hCG secretion (Fig. 4) and cell fusion (Fig. 5) when compared with untreated cells. LIF prevented biochemical differentiation by reducing forskolin-induced β hCG production from 406 ± 54 ng/ml to 222 ± 22 ng/ml (Fig. 4). Inhibition of JAK/STAT signaling pathway significantly prevents the inhibitory effect of LIF on forskolin-induced β hCG secretion (329 ± 52 ng/ml). MAPK3/1 inhibition did not mediate or counteract the inhibitory effect of LIF on forskolin-induced β hCG release, the amount of β hCG released by BeWo cells being 214 ± 19 ng/ml (Fig. 4).

In contrast to β hCG production, LIF sustains morphological differentiation by amplifying the effect of forskolin on cell fusion, the loss of E-cadherin staining between the cells being more pronounced than that observed with forskolin alone (Fig. 5A). The

synergistic effect of LIF in forskolin-induced morphological differentiation is however impaired by the inhibition of the JAK/STAT signaling pathway. In fact, a pretreatment with JAK inhibitor I abrogates the stimulatory action of LIF through an important increase in E-cadherin expression (Fig. 5A). Similarly, PD98059 inhibition of MAPK3/1 prevents the stimulatory effect of LIF on forskolin-induced cell fusion since the expression of E-cadherin is even stronger than that observed with forskolin alone (Fig. 5A). To confirm the effects on syncytialization, E-cadherin expression in BeWo cells was quantified by immunoblotting analysis using β -actin as internal control. Data from western blot and densitometry analysis was expressed as E-cadherin/ β -actin ratio in figure 5B. As expected (Fig. 1C), BeWo cell E-cadherin expression is reduced by $48\% \pm 6\%$ in the presence of forskolin (from 1.00 ± 0.08 to 0.52 ± 0.06) and by $75\% \pm 5\%$ in the presence of forskolin and LIF (from 1.00 ± 0.08 to 0.25 ± 0.06). Our results have confirmed that the synergistic effect of LIF on forskolin-induced cell fusion is impaired by the inhibition of both the JAK/STAT and MAPK3/1 signaling pathways, the relative E-cadherin expression levels being $9\% \pm 7\%$ below of control (from 1.00 ± 0.08 to 0.90 ± 0.08) in cells pretreated with JAK inhibitor I, and $16\% \pm 8\%$ below of control (from 1.00 ± 0.08 to 0.90 ± 0.08) in cells pretreated with PD98059.

DISCUSSION

The ability of human trophoblasts to undergo differentiation and fuse into a multinucleated structure while acquiring an active endocrine phenotype is known to be under the control of a multitude of factors including hormones and cytokines. Indeed, factors such as epidermal growth factor (EGF) [31], 17β -estradiol [35], granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) [36], macrophage colony stimulating factor (M-CSF) [36], adiponectin [37] and hCG [38] were found to enhance human cytotrophoblasts syncytial fusion while tumor necrosis factor α (TNF) [39] and tumor growth factor β 1 (TGFB1) [40] were reported as negative regulators of this process. These factors regulate the overall differentiation process through the activation of signaling pathways important for the transcription of specific cassettes of genes which mediate both axes of trophoblast differentiation to syncytiotrophoblast. Among these pathways, MAPK3/1 and p38 MAP kinases signaling pathways were shown to mediate stimulating effect toward villous trophoblast fusion and BeWo cell fusogenic activity [17, 18, 41-43]. Previous studies linked MAPK3/1 activity to β hCG secretion and cell fusion by villous cytotrophoblasts [17] and the choriocarcinoma cell line JAR *in vitro* [44]. In mice, Takahashi et al. [45] have recently established that LIF receptor signaling is finely coordinated by JAK1, STAT3, and suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3, and demonstrated that LIF/JAK1/STAT3/SOCS3 signaling is an essential pathway for the regulation of trophoblast giant cell differentiation. In human, no data is yet available concerning the regulatory mechanism of LIF/JAK/STAT pathway in trophoblast cell survival/proliferation or differentiation. However, studies suggest that STAT3 is not involved in β hCG secretion in JAR cells [44]. In purified human cytotrophoblasts from term placentas, which lack the capacity to proliferate when growing in culture [21, 22], LIF did not affect cell viability or cell proliferation of cultured cells [46]. In contrast to cell proliferation, spontaneous differentiated cells treated with LIF have been shown to express significantly lower levels of β hCG than the control untreated ones. Kojima and colleagues [47] have demonstrated that LIF receptor subunits LIFR and IL6ST are expressed in trophoblast-like BeWo cells and then that LIF can efficiently trigger changes in their behaviour by inhibiting forskolin-induced hCG secretion. Similar results

have been observed by Ren et al. [48] in JEG-3 cells which remain mononucleated when challenged with forskolin as opposed to BeWo cells, reported as a fusogenic model [25]. In this context, we have shown that LIF, rather than exerting a direct effect on BeWo cell differentiation, influences the forskolin-induced changes by a somehow contradictory manner through the reduction of biochemical differentiation and stimulation of morphological differentiation.

In respect to the diverging actions of LIF in BeWo cell fusion and β hCG secretion, the hypothesis rising from the work of Orendi and co-workers [19] is noteworthy, highlighting the possibility of a distinct regulation of hCG synthesis and cell fusion. The authors suggest that cell fusion is regulated through a PRKA-dependent mechanism only whereas hCG secretion is regulated by two different pathways, one PRKA-dependent and a second PRKA-independent. In the first, PRKA stimulates the activity of the transcription factor glial cells missing a (GCMa) [34]. Target genes of GCMa include the classical fusion proteins syncytine-1 and 2, which are directly involved in trophoblast fusion [34, 49]. Besides, the PRKA also allows the phosphorylation of the transcription factors Old astrocyte specifically-induced substance (OASIS) and cAMP response element binding protein (CREB) who also participate in the transcription of GCMa [18, 49]. Moreover, MAPK3/1 is required for the phosphorylation of transcription factor CREB downstream PRKA [18]. In this context, we have first remarked that the inhibition of MAPK3/1 pathway impairs the effect of LIF on forskolin-induced cell fusion but have no effects on hCG secretion. Based on the fact that LIF enhanced MAPK3/1 pathway activation, it is likely that the effect of LIF on cell fusion relies on a cooperative cross-talk between LIF-induced activation of MAPK3/1 and forskolin-induced activation of PRKA signaling pathways. A similar converging mechanism could be proposed for the JAK/STAT pathway, while we can speculate that homo- and/or heterodimers of STAT1 and STAT3 could also directly or indirectly act as co-activators of fusion-related gene promoters. Thus by inhibiting the activation of MAPK3/1 and JAK/STAT signaling pathways, the expression of fusion-related genes which are induced only in a PRKA-dependent way are altered and the fusogenic capacity of BeWo cells is greatly affected. On the opposite, the inhibition of MAPK3/1

pathway does not affect the inhibitory effect of LIF on hCG secretion, suggesting that the negative effect of the cytokine on hCG secretion does not involve the activation of effectors downstream MAPK3/1 (and PRKA) signaling pathway.

As noted above, the negative effect of LIF reported in this study toward forskolin-induced hCG secretion is supported by previous studies [46-48]. Given that hCG mRNA and protein expression upon LIF stimulation is down regulated in primary trophoblasts [46] and in BeWo cells [47], it is possible that the cytokine interferes with hCG expression at the transcriptional level. This might occur through LIF-induced activation of STAT3 that could exert a negative control, directly or indirectly by acting in proximal or distal transcriptional activators of the hCG genes. In accordance with this proposed mechanism, a recent study has demonstrated that the inhibitory effects of interleukin (IL)10 on antigen-presenting capacity of interferon gamma (IFNG)-stimulated human macrophages may act, via STAT3, by a negative transcriptional regulation of cathepsin S and major histocompatibility complex (MHC)-II genes [50]. Therefore, a detailed promoter analysis would be required to explore whether STAT3, and even STAT1 or STAT1-STAT3 heterodimers, plays a role in mediating the inhibitory action of LIF on the promoters of hCG gene and an opposed positive action of LIF on fusion-related gene promoters.

In conclusion, we have demonstrated that LIF-mediated stimulation of fusogenic activity in BeWo cells depends on the activation of both JAK/STAT and MAPK3/1 pathways. On the other hand, although MAPK3/1 mediates the action of LIF on cell fusion, it is not involved in the inhibitory effect of LIF on β hCG secretion. The JAK/STAT signaling pathway, however, mediates the diverging actions of LIF on cell fusion and β hCG secretion. These data have important implications for understanding the complex regulatory processes governing syncytialization. Hence, although previous reports have conferred a role for the cytokine especially in trophoblast differentiation toward the invasive phenotype [11-13], it also provides evidence concerning the possible regulation of fusion-related proteins by LIF, which still remain to be further investigated.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge Dr. Lionel Berthoux and Monique Cadrin for providing the materials for IF analyses. We also thank Mélodie B. Plourde for technical assistance.

REFERENCES

1. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 2006; 12:731-746.
2. van Mourik MS, Macklon NS, Heijnen CJ. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J Leukoc Biol* 2009; 85:4-19.
3. Cheng JG, Chen JR, Hernandez L, Alvord WG, Stewart CL. Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:8680-8685.
4. Lass A, Weiser W, Munafo A, Loumaye E. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertil Steril* 2001; 76:1091-1096.
5. Aghajanova L. Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1034:176-183.
6. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; 374:1-20.
7. Kimber SJ. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction* 2005; 130:131-145.
8. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359:76-79.
9. Hambartsoumian E. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39:137-143.
10. Kralickova M, Sima R, Vanecek T, Sima P, Rokyta Z, Ulcova-Gallova Z, Sucha R, Uher P, Hes O. Leukemia inhibitory factor gene mutations in the population of infertile women are not restricted to nulligravid patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 127:231-235.

11. Poehlmann TG, Fitzgerald JS, Meissner A, Wengenmayer T, Schleussner E, Friedrich K, Markert UR. Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3. *Placenta* 2005; 26 Suppl A:S37-41.
12. Tapia A, Salamonsen LA, Manuelpillai U, Dimitriadis E. Leukemia inhibitory factor promotes human first trimester extravillous trophoblast adhesion to extracellular matrix and secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2. *Hum Reprod* 2008; 23:1724-1732.
13. Fitzgerald JS, Tsareva SA, Poehlmann TG, Berod L, Meissner A, Corvinus FM, Wiederanders B, Pfitzner E, Markert UR, Friedrich K. Leukemia inhibitory factor triggers activation of signal transducer and activator of transcription 3, proliferation, invasiveness, and altered protease expression in choriocarcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37:2284-2296.
14. Sharkey AM, King A, Clark DE, Burrows TD, Jokhi PP, Charnock-Jones DS, Loke YW, Smith SK. Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. *Biol Reprod* 1999; 60:355-364.
15. Chen HF, Chao KH, Shew JY, Yang YS, Ho HN. Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor is not altered in the decidua and chorionic villi of human anembryonic pregnancy. *Human reproduction* 2004; 19:1647-1654.
16. Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Inoue T, Horie K, Nakayama H, Fujita J, Mori T. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biol Reprod* 1994; 50:882-887.
17. Daoud G, Amyot M, Rassart E, Masse A, Simoneau L, Lafond J. ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. *J Physiol* 2005; 566:409-423.
18. Delidaki M, Gu M, Hein A, Vatish M, Grammatopoulos DK. Interplay of cAMP and MAPK pathways in hCG secretion and fusogenic gene expression in a trophoblast cell line. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 332:213-220.
19. Orendi K, Gauster M, Moser G, Meiri H, Huppertz B. The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins. *Reproduction* 2010; 140:759-766.

20. Liu F, Soares MJ, Audus KL. Permeability properties of monolayers of the human trophoblast cell line BeWo. *The American journal of physiology* 1997; 273:C1596-1604.
21. Wice B, Menton D, Geuze H, Schwartz AL. Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. *Exp Cell Res* 1990; 186:306-316.
22. Coutifaris C, Kao LC, Sehdev HM, Chin U, Babalola GO, Blaschuk OW, Strauss JF, 3rd. E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts. *Development* 1991; 113:767-777.
23. Friedman SJ, Skehan P. Morphological differentiation of human choriocarcinoma cells induced by methotrexate. *Cancer research* 1979; 39:1960-1967.
24. Kudo Y, Boyd CA, Sargent IL, Redman CW, Lee JM, Freeman TC. An analysis using DNA microarray of the time course of gene expression during syncytialization of a human placental cell line (BeWo). *Placenta* 2004; 25:479-488.
25. Al-Nasiry S, Spitz B, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* 2006; 21:193-201.
26. Dufresne M, Dumas G, Asselin E, Carrier C, Pouliot M, Reyes-Moreno C. Pro-inflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages differentially modulate cell survival and invasion of human bladder carcinoma T24 cells. *Mol Immunol* 2011; 48:1556-1567.
27. Fischer I, Redel S, Hofmann S, Kuhn C, Friesen K, Walzel H, Jeschke U. Stimulation of syncytium formation in vitro in human trophoblast cells by galectin-1. *Placenta* 2010; 31:825-832.
28. Arimoto-Ishida E, Sakata M, Sawada K, Nakayama M, Nishimoto F, Mabuchi S, Takeda T, Yamamoto T, Isobe A, Okamoto Y, Lengyel E, Suehara N, et al. Up-regulation of alpha5-integrin by E-cadherin loss in hypoxia and its key role in the migration of extravillous trophoblast cells during early implantation. *Endocrinology* 2009; 150:4306-4315.

29. Reyes-Moreno C, Sharif-Askari E, Girouard J, Leveille C, Jundi M, Akoum A, Lapointe R, Darveau A, Mourad W. Requirement of oxidation-dependent CD40 homodimers for CD154/CD40 bidirectional signaling. *J Biol Chem* 2007; 282:19473-19480.
30. Reyes-Moreno C, Girouard J, Lapointe R, Darveau A, Mourad W. CD40/CD40 homodimers are required for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of B7.2 by human B lymphocytes. *J Biol Chem* 2004; 279:7799-7806.
31. Morrish DW, Bhardwaj D, Dabbagh LK, Marusyk H, Siy O. Epidermal growth factor induces differentiation and secretion of human chorionic gonadotropin and placental lactogen in normal human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65:1282-1290.
32. Seamon KB, Padgett W, Daly JW. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78:3363-3367.
33. Keryer G, Alsat E, Tasken K, Evain-Brion D. Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 7):995-1004.
34. Knerr I, Schubert SW, Wich C, Amann K, Aigner T, Vogler T, Jung R, Dotsch J, Rascher W, Hashemolhosseini S. Stimulation of GCMA and syncytin via cAMP mediated PKA signaling in human trophoblastic cells under normoxic and hypoxic conditions. *FEBS Lett* 2005; 579:3991-3998.
35. Cronier L, Guibourdenche J, Niger C, Malassine A. Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta* 1999; 20:669-676.
36. Garcia-Lloret MI, Morrish DW, Wegmann TG, Honore L, Turner AR, Guilbert LJ. Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CSF-1 and GM-CSF stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion. *Exp Cell Res* 1994; 214:46-54.

37. Benaitreau D, Santos ED, Leneveu MC, De Mazancourt P, Pecquery R, Dieudonne MN. Adiponectin promotes syncytialisation of BeWo cell line and primary trophoblast cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8:128-139.
38. Shi QJ, Lei ZM, Rao CV, Lin J. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* 1993; 132:1387-1395.
39. Leisser C, Saleh L, Haider S, Husslein H, Sonderegger S, Knofler M. Tumour necrosis factor-alpha impairs chorionic gonadotrophin beta-subunit expression and cell fusion of human villous cytotrophoblast. *Mol Hum Reprod* 2006; 12:601-609.
40. Morrish DW, Bhardwaj D, Paras MT. Transforming growth factor beta 1 inhibits placental differentiation and human chorionic gonadotropin and human placental lactogen secretion. *Endocrinology* 1991; 129:22-26.
41. Daoud G, Le bellego F, Lafond J. PP2 regulates human trophoblast cells differentiation by activating p38 and ERK1/2 and inhibiting FAK activation. *Placenta* 2008; 29:862-870.
42. Vaillancourt C, Lanoix D, Le Bellego F, Daoud G, Lafond J. Involvement of MAPK signalling in human villous trophoblast differentiation. *Mini Rev Med Chem* 2009; 9:962-973.
43. Mounier C, Barbeau B, Vaillancourt C, Lafond J. Endocrinology and cell signaling in human villous trophoblast. *Methods Mol Biol* 2009; 550:89-102.
44. Jiang K, Chen Y, Jarvis JN. hCG Secretion in human choriocarcinoma JAR cells is MAPK but not Stat3 dependent: contributions of TNFalpha and IL-1beta to inflammation-induced hCG secretion. *Placenta* 2006; 27:853-860.
45. Takahashi Y, Takahashi M, Carpino N, Jou ST, Chao JR, Tanaka S, Shigeyoshi Y, Parganas E, Ihle JN. Leukemia inhibitory factor regulates trophoblast giant cell differentiation via Janus kinase 1-signal transducer and activator of transcription 3-suppressor of cytokine signaling 3 pathway. *Molecular endocrinology* 2008; 22:1673-1681.
46. Nachtigall MJ, Kliman HJ, Feinberg RF, Olive DL, Engin O, Arici A. The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation: a potential role in human implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:801-806.

47. Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Narukawa S, Higuchi T, Kaneko Y, Mori T, Fujita J. Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts. *Hum Reprod* 1995; 10:1907-1911.
48. Ren SG, Melmed S, Braunstein GD. Decidual leukemia inhibitory factor production and action on human chorionic gonadotropin secretion at different stages of gestation in vitro. *Early Pregnancy* 1997; 3:102-108.
49. Schubert SW, Abendroth A, Kilian K, Vogler T, Mayr B, Knerr I, Hashemolhosseini S. bZIP-Type transcription factors CREB and OASIS bind and stimulate the promoter of the mammalian transcription factor GCMA/Gcm1 in trophoblast cells. *Nucleic acids research* 2008; 36:3834-3846.
50. Chan LL, Cheung BK, Li JC, Lau AS. A role for STAT3 and cathepsin S in IL-10 down-regulation of IFN-gamma-induced MHC class II molecule on primary human blood macrophages. *Journal of leukocyte biology* 2010; 88:303-311.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of LIF on forskolin-induced BeWo cell differentiation

Cells were treated for 48 h with DMSO as vehicle (control), 50 ng/ml LIF, 10 μ M forskolin (FK) alone or in combination with LIF. **(A)** Biochemical differentiation. β hCG production was determined by ELISA. Data was expressed as hCG secretion normalized with relative cell number, as determined by the absorbance measures from MTT viability/proliferation assays. Each bar represents the mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicates. Different superscripts denote significant differences between treatments. * $p < 0.001$ as compared with control; ** $p < 0.001$ as compared with 10 μ M FK alone. **(B)** Morphological differentiation analysis by immunofluorescence. Cell fusion was evaluated by the reduction of the expression of E-cadherin (green) and cell nuclei (blue) were stained with Hoescht 33258. **(C)** Morphological differentiation analysis by immunoblotting. E-cadherin detection was assessed using a monoclonal anti-E-cadherin antibody. Human β -actin expression was used as an internal control for semi-quantitative analysis of E-cadherin protein expression. A representative result from three independent experiments is shown. Results were expressed as the ratio of E-cadherin/ β -actin protein. Each bar represents the mean \pm SD of three independent experiments. Different superscripts denote significant differences between treatments. * $p < 0.001$ as compared with control; ** $p < 0.001$ as compared with 10 μ M FK alone.

Figure 2. Time course of the LIF-dependent activation of STAT1, STAT3 and MAPK3/1 signaling molecules in BeWo cells

Cells were serum depleted overnight and treated for the indicated times with DMSO (control), 10 μ M forskolin (FK), and 50 ng/ml LIF alone or in combination with 10 μ M FK. To control and correct for protein loading error, β -actin expression was used as an internal control. **(A)** A representative result from three independent experiments is shown. **(B)** Results were expressed as fold induction of control relative to the ratio phosphorylation-activated protein to β -actin protein, and presented as mean \pm SD from

three independent experiments. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, significantly increased when compared with control and/or FK alone.

Figure 3. Effectiveness of chemical inhibitors in LIF-induced signaling pathways activation in BeWo cells

Cells were pretreated for 60 min with either vehicle (DMSO), 5 μ M JAK inhibitor I or 50 μ M PD98059 and then cells were left untreated or challenged for 15 min with either 10 μ M forskolin (FK) alone or 50 ng/ml LIF \pm 10 μ M FK. **(A)** The efficiency of pharmacological inhibitors was determined by Western blotting. A representative result from three independent experiments is shown. **(B)** Results were expressed as the ratio of phosphorylated/no phosphorylated protein, and presented as mean \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, significantly decreased when compared with LIF alone or LIF+FK.

Figure 4. Role of JAK/STAT and MAPK3/1 signaling pathways in the regulation of LIF on forskolin-induced BeWo cell β hCG expression

BeWo cells were pretreated with vehicle or chemical inhibitors and then cells were left untreated or challenged for 48 h with 10 μ M forskolin (FK) or 50 ng/ml LIF and 10 μ M FK. β hCG was quantified by ELISA. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicates. Different superscripts denote significant differences between treatments. * $p < 0.001$ significantly decreased compared with forskolin alone; ** $p < 0.001$ significantly increased compared with LIF+FK.

Figure 5. Role of JAK/STAT and MAPK3/1 signaling pathways in the influence of LIF on forskolin-induced BeWo cell syncytialization

BeWo cells were pretreated with vehicle or chemical inhibitors and then cells were left untreated or challenged for 48 h with 10 μ M forskolin (FK) or 50 ng/ml LIF and 10 μ M FK.

(A) E-cadherin (green) expression was evaluated by immunofluorescence. Nuclei were stained using Hoescht 33258. All observations were performed at 20X magnification. Identical results were obtained from three independent experiments and at least

five fields were randomly examined in each experiment. **(B)** To quantify BeWo cell fusion, E-cadherin and human β -actin expressions were used for semi-quantitative analysis of E-cadherin protein expression. A representative result from three independent experiments is shown. Results were expressed as the ratio of E-cadherin/ β -actin protein. Each bar represents the mean \pm SD of three independent experiments. Different superscripts denote significant differences between treatments. * $p < 0.001$ as compared with FK; ** $p < 0.001$ as compared with LIF+FK.

Figure 1, Leduc et al. 2011

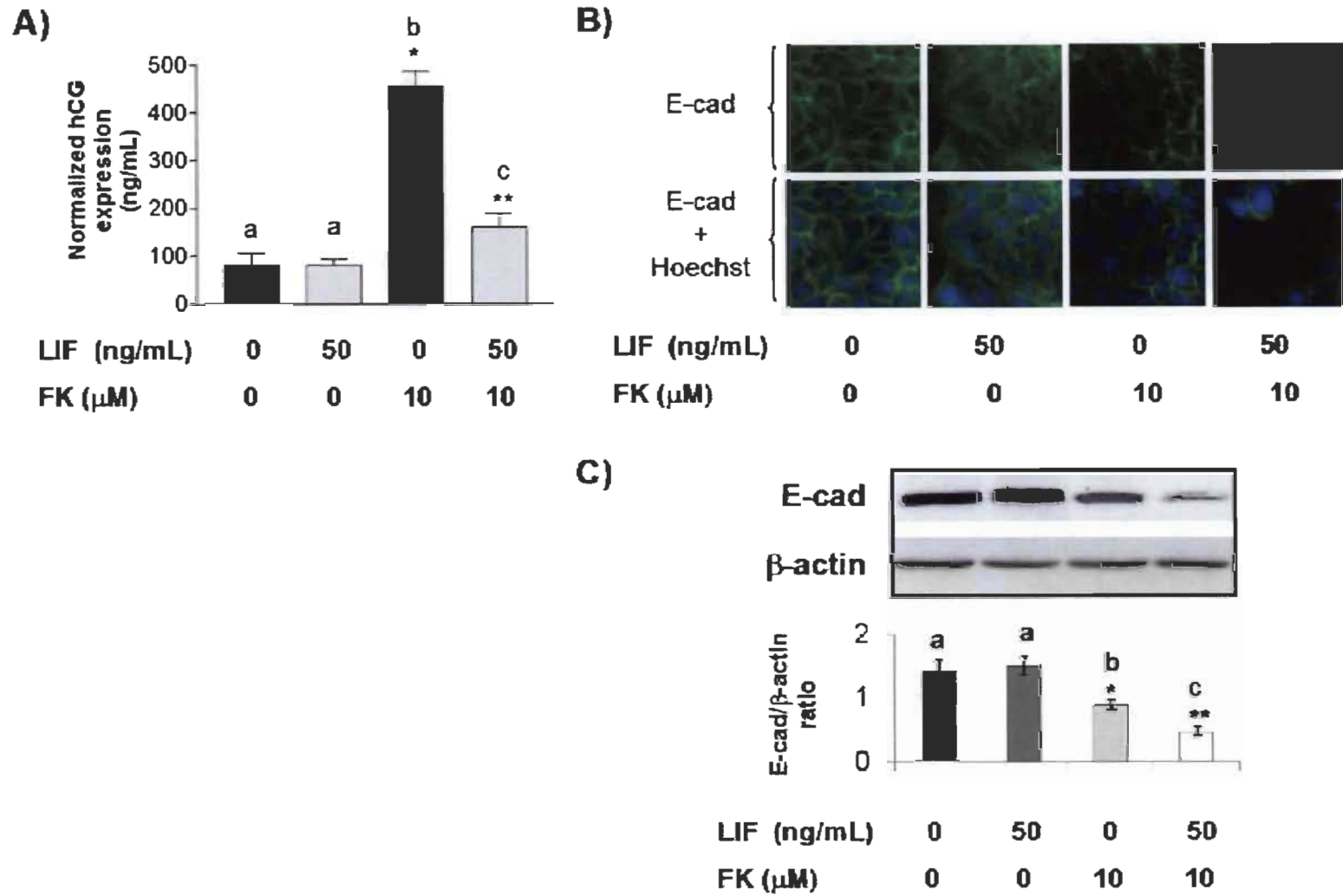


Figure 2, Leduc et al. 2011

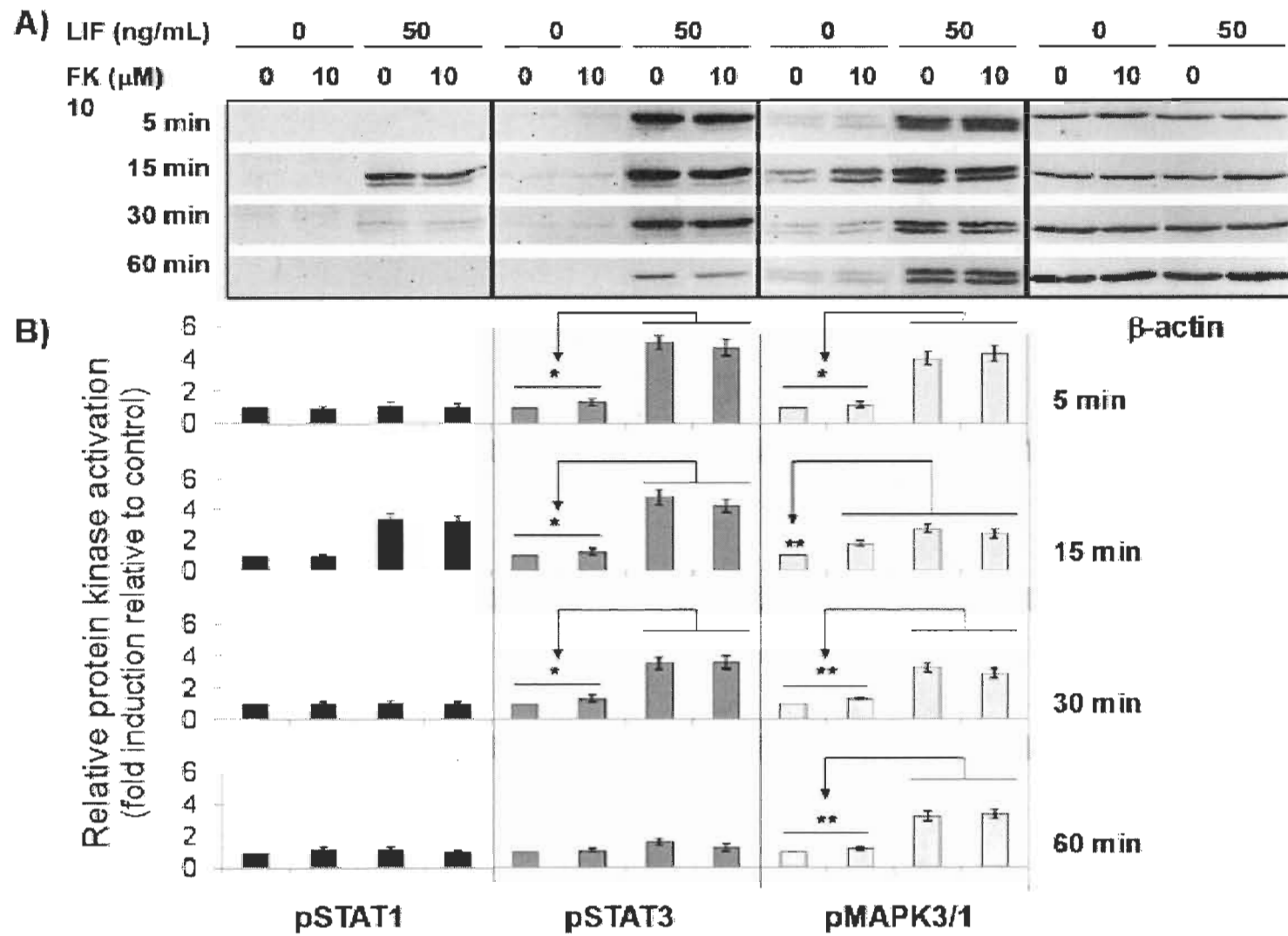
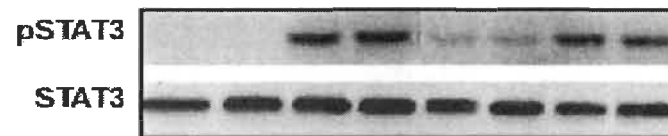


Figure 3, Leduc et al. 2011

A)

JAK inh I (μ M)	0		0		5		0	
PD98059 (μ M)	0		0		0		50	
LIF (ng/mL)	0		50		50		50	
FK (μ M)	0	10	0	10	0	10	0	10



B)

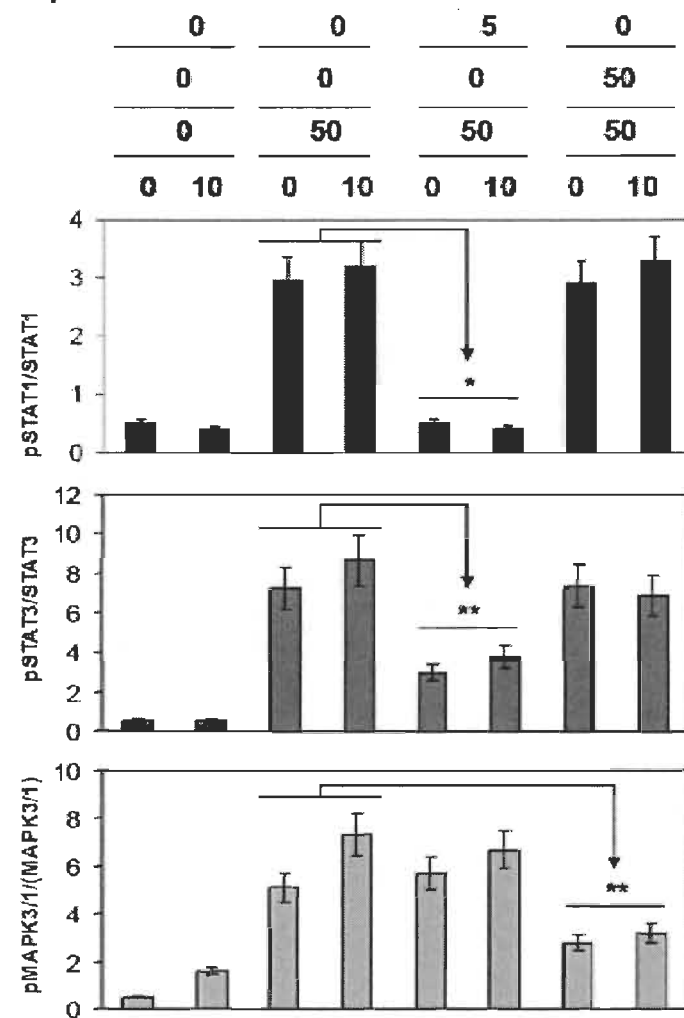


Figure 4, Leduc et al. 2011

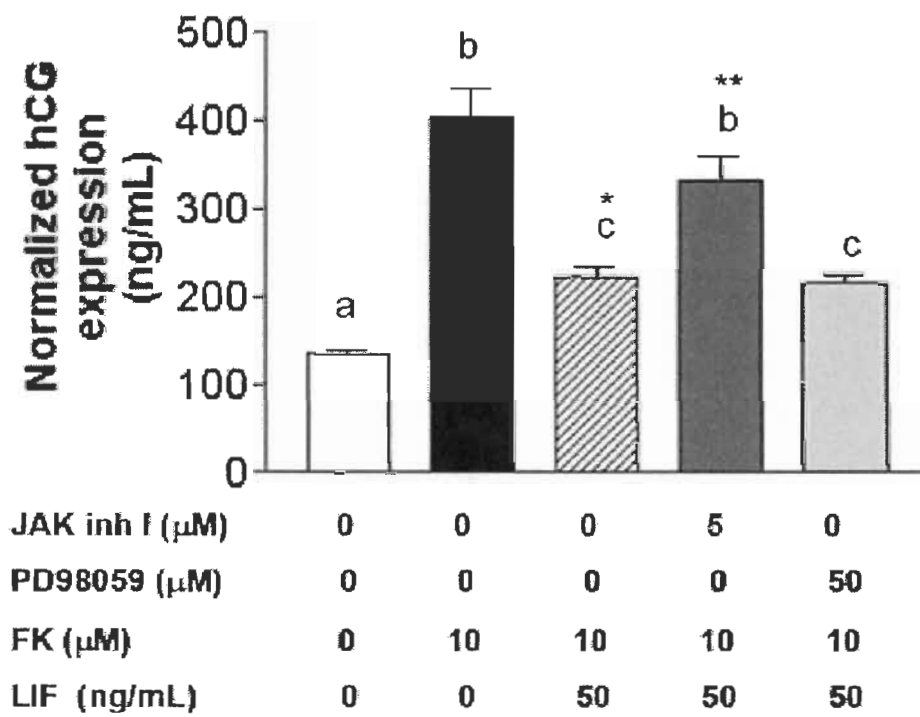
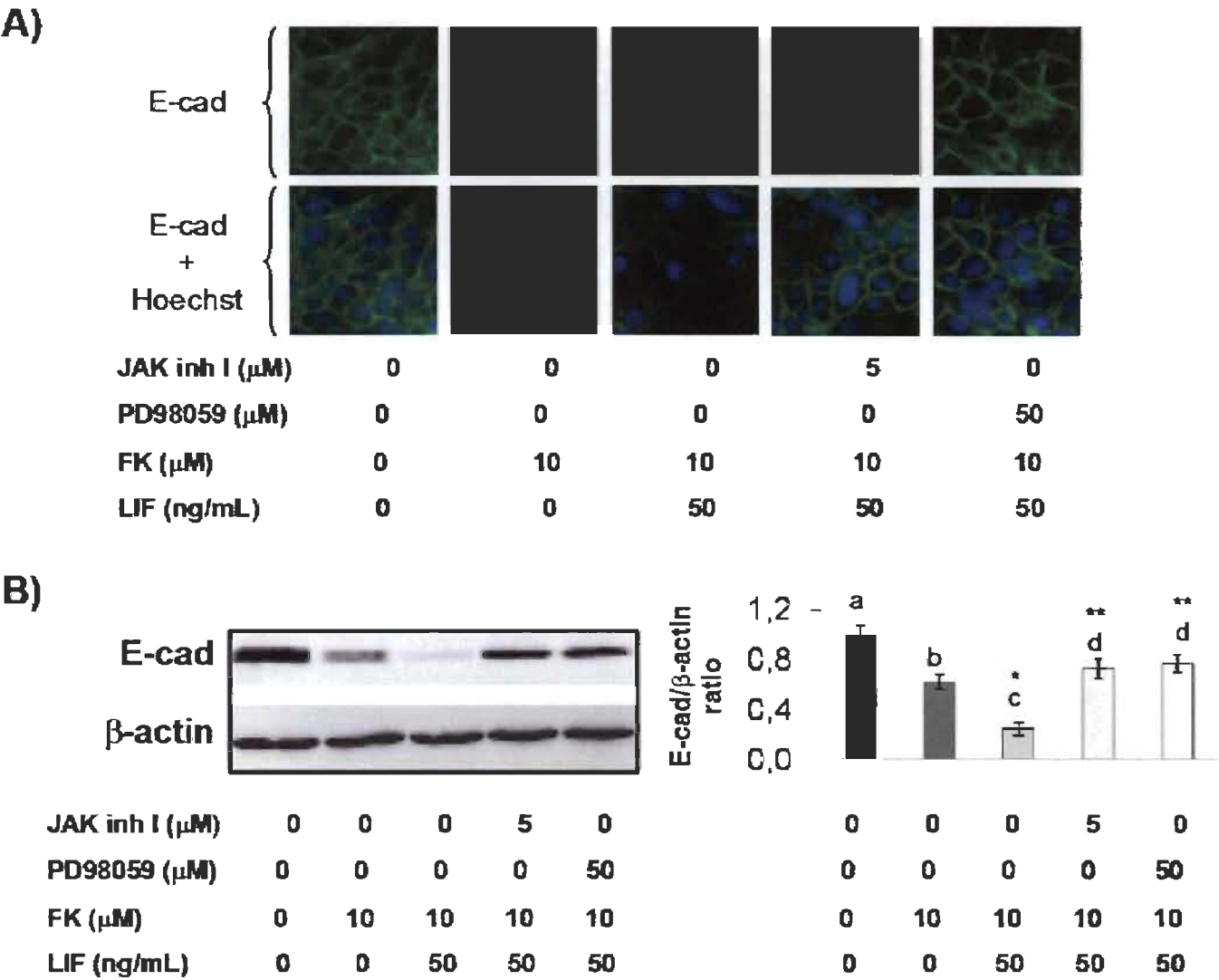


Figure 5, Leduc et al. 2011



CHAPITRE III

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les anomalies de la différenciation des trophoblastes sont remarquées dans plusieurs types de complications périnatales [43, 53, 170]. L'altération du processus de différenciation des CTV en ST, plus précisément de la fusion syncytiale, est observée notamment dans des cas de restriction de croissance intrautérine [171]. La réduction de l'activité de fusion des CTV cause la diminution du volume du syncytium les recouvrant et, du coup, de la surface disponible pour les échanges de gaz et de nutriments entre la mère et le fœtus [29, 31]. Par conséquent, les capacités fonctionnelles placentaires sont réduites et ne suffisent pas à soutenir le développement fœtal normal, causant, dans les cas les plus sévères, la mort du fœtus *in utero* [171]. De plus, une altération des fonctions endocrines apparaît contribuer à l'étiologie de la restriction de la croissance intrautérine [53]. En effet, un faible niveau de β hCG lors du premier trimestre de la grossesse est corrélé à l'augmentation de la prévalence de cette pathologie [53]. Cependant, le manque de connaissances relatives aux mécanismes de fusion et d'acquisition des fonctions endocrines rend difficile la prévention de ce type de complication. Les composants cellulaires, matriciels et les facteurs solubles maternels et/ou fœtaux impliqués à la fois dans différenciation morphologique et biochimique des CTV en ST ne sont que partiellement identifiés et leur action est mal comprise. Alors que l'importance singulière de cytokines comme l'IL-11 et le LIF est bien établie quant à l'implantation embryonnaire [172], leur effet au niveau de la placentation n'est qu'élusive. Néanmoins, plusieurs indices portent à croire que le LIF pourrait être un acteur important dans la différenciation des CTV en ST, notamment sa présence au sein de l'environnement des ST et l'expression des éléments du récepteur de la cytokine par ces mêmes cellules [17, 18]. Le projet proposé dans ce mémoire visait ainsi à mieux décrire l'effet biologique du LIF sur la différenciation des CTV en ST de même que le mécanisme moléculaire par lequel la cytokine module chaque aspect de ce processus. La visée d'une telle étude est l'acquisition de connaissances fondamentales supplémentaires

permettant de mieux décrire le phénomène physiologique normal assurant la différenciation des CTV en ST, permettant donc de mieux comprendre les dysfonctions associées. Ultimement, une meilleure description de l'action du LIF pourrait permettre de proposer des avenues thérapeutiques potentielles.

3.1 Le LIF et la fusion des trophoblastes

Nos résultats confirment que la forskoline stimule la fusion des cellules BeWo et permettent de proposer un mécanisme moléculaire par lequel le LIF module cet aspect de la différenciation. Alors que le diterpène est connu pour augmenter la fusion en activant la voie AMPc/PRKA, il est aussi établi que la voie MAPK3/1 MAP kinase peut être activée en réponse à la forskoline [65]. Cette seconde voie agit alors de manière conjointe à la première en participant à l'expression de gènes impliqués dans la fusion. Or, cette interaction entre la voie AMPc/PRKA et MAPK3/1 MAP kinase n'a pas été observée au cours de la présente étude en raison de la concentration de forskoline employée (10 μ M). Celle-ci est dix fois moins importante que celle utilisée lors de l'étude de Delidaki *et al.* [65] décrivant les interactions entre ces deux voies. Ainsi, il est fort probable qu'à 10 μ M, la forskoline n'a que peu d'effet sur l'activation de MAPK3/1. Ceci est confirmé par les immunobuvardages de type Western ne révélant qu'une légère augmentation de la phosphorylation de MAPK3/1 suite à un traitement de cinq à soixante minutes des cellules BeWo en absence versus en présence de forskoline. Par conséquent, il a aussi été déterminé que l'inhibition de l'activation de MAPK3/1 au moyen de l'inhibiteur chimique PD98059 lors d'un traitement avec 10 μ M forskoline n'affecte pas les capacités de fusion des cellules BeWo (voir annexe A, figure A.1B). Cependant, toujours en raison des interactions entre les voies AMPc/PRKA et MAPK3/1 MAP kinase, il apparaît probable qu'un facteur permettant l'activation de MAPK3/1 puisse stimuler la fusion cellulaire et compenser la faible activation de la voie AMPc/PRKA. À ce titre, nous avons démontré qu'un traitement avec du LIF génère une augmentation importante de la phosphorylation de la kinase MAPK3/1 et que cet effet est d'autant plus important lors d'un traitement conjoint de LIF et de forskoline. Toutefois, en dépit de l'activation de MAPK3/1 par le LIF seul, cette cytokine n'est pas

apte à augmenter la fusion des cellules BeWo. En présence de forskoline, le LIF a permis de potentialiser l'action du diterpène, donc de stimuler davantage la fusion cellulaire. Ceci suggère que la forskoline, à 10 μ M, n'active que faiblement la voie AMPc/PRKA et que l'ajout de LIF compense pour cette faible activation en stimulant plutôt la voie MAPK3/1 MAP kinase. Or, ces deux voies convergent vers la phosphorylation de CREB qui peut augmenter l'activité de transcription de GCMA [61, 65], puis ce facteur de transcription stimule la fusion des cellules BeWo. Ainsi, le LIF pourrait stimuler la phosphorylation de CREB via MAPK3/1 et augmenter la fusion induite par la forskoline. De plus amples expérimentations s'avèrent cependant nécessaires à la démonstration de cette hypothèse. Il serait ainsi fort intéressant d'établir la capacité du LIF à activer les facteurs de transcription CREB et GCMA. L'inhibition spécifique de MAPK3/1 au moyen d'inhibiteurs pharmacologiques comme le PD98059 ou d'un petit ARN interférent (*siRNA*) permettrait d'évaluer la participation de la voie de MAPK3/1 dans l'activation de CREB et de GCMA par la cytokine, dans l'optique où celle-ci est d'abord vérifiée.

Dans un second temps, nous avons démontré l'implication de la voie JAK/STAT dans le processus de fusion des cellules BeWo. Ce point, d'ailleurs, est particulièrement intéressant en raison de l'actuelle absence d'informations permettant l'association de cette voie à un tel processus cellulaire. Peu d'études font mention de l'implication de la voie JAK/STAT dans la différenciation des CT en ST alors que le rôle de celle-ci s'avère évident au niveau des capacités invasives des CTEV ou des modèles équivalents [33, 75, 101, 106, 109]. Ainsi, l'attribution d'un rôle pour cette voie à titre de régulateur direct ou indirect de la fusion revêt un caractère nouveau et souligne l'existence d'interactions jusqu'ici peu définies entre la voie JAK/STAT et la voie AMPc/PRKA. Nos résultats suggèrent d'abord que les interactions entre ces voies ne sont pas directes. En effet, la forskoline seule ne peut activer ni STAT1 ni STAT3, mais ces deux facteurs de transcription sont phosphorylés suite à l'ajout de LIF. De plus, l'inhibiteur des JAK, le *JAK inhibitor 1*, n'affecte pas la fusion induite par la forskoline, mais réduit de manière importante l'effet stimulant du LIF en présence de forskoline (voir annexe A, figure A.1B). L'activation de la voie JAK/STAT apparaît alors parallèle à celle de la

voie AMPc/PRKA, non pas complémentaire comme dans le cas de la voie MAPK3/1 MAP kinase, et pourrait réguler directement certains gènes liés à la fusion plutôt qu'amplifier leur expression via la PRKA. Ainsi, en raison du rôle peu défini de l'homo- et hétérodimérisation des STAT, il semble probable que les dimères de STAT1 et STAT3 pourraient réguler certains gènes en se liant soit au niveau de régions nucléotidiques précises via une association avec des activateurs ou répresseurs de transcription distaux ou proximaux, donc agir à titre de co-activateur ou co-répresseur. Le facteur de transcription p300/*CREB binding protein* (p300/CBP), par exemple, est connu interagir avec plusieurs STAT, dont STAT1 et STAT3, et agir à titre de co-activateur de la transcription de certains gènes chez des types cellulaires autres que les CT [173-177]. En effet, p300/CBP est un effecteur de CREB et ce dernier est impliqué dans l'induction de gènes liés à la fusion dont GCMA [61]. Ainsi, l'association de p300/CBP à des homo- ou hétérodimères de STAT1/STAT3 formés en réponse au LIF pourrait augmenter la fusion induite par la forskoline en stimulant la transcription de gènes liés à la fusion via la phosphorylation de CREB, dont GCMA et ses cibles, les syncytine-1 et -2. La voie JAK/STAT pourrait donc soutenir et amplifier l'activité d'un facteur de transcription activé, en parallèle, par la PRKA. Sur ce point, des analyses par co-immunoprécipitation seraient révélatrices de l'association entre p300/CBP et les divers dimères de STATs lors de la fusion des CT. De même, une étude plus approfondie visant à déterminer la présence d'éléments de réponse aux STAT à l'intérieur des séquences promotrices de gènes liés à la fusion pourrait associer plus directement ces facteurs de transcription à la régulation de ce processus et serait requise afin d'expliquer l'effet observé dans la présente étude.

Quelques études menées chez d'autres types cellulaires suggèrent aussi que la voie JAK/STAT pourrait agir à titre d'intermédiaire dans l'activation de la voie MAPK3/1 MAP kinase [178, 179], tel qu'illustré à la figure 3.1. En effet, l'interféron gamma (IFNG), connu pour activer la voie JAK/STAT, permet aussi l'activation de la voie MAPK3/1 MAP kinase [179]. Cependant, aucune activation de la seconde voie n'est observée chez des cellules n'exprimant pas JAK1 [178]. L'activation de la voie MAPK3/1 MAP kinase requiert la liaison d'un ligand à un récepteur tyrosine kinase ou

couplé à une protéine G, ces deux derniers permettant l'activation de Ras [88]. Or, le récepteur du LIF ne possède pas d'activité kinase intrinsèque et n'est pas associé à une protéine G, mais parvient tout de même à entraîner la phosphorylation de MAPK3/1. Par conséquent, une protéine adaptatrice doit être présente au sein d'un complexe membranaire associé au récepteur du LIF afin de compenser l'absence d'activité kinase intrinsèque ou de protéine G. Ce rôle pourrait être attribué à JAK1 qui procéderait à la phosphorylation de Ras, entraînant la subséquente activation de Raf-1, laquelle phosphoryle la MAP2K1/2 qui, au final, active MAPK3/1 [81]. Ainsi, d'un côté, le LIF pourrait compenser la faible activation de la voie AMPc/PRKA par la forskoline en stimulant l'activation de MAPK3/1. D'un autre côté, la cytokine peut entraîner l'activation de JAK1 qui jouerait un rôle d'adaptateur et d'intermédiaire entre les voies JAK/STAT et MAPK3/1 MAP kinase. Par conséquent, JAK1 pourrait participer indirectement à l'activation de CREB et GCMA, donc à l'expression de gènes tels les *syncytines-1* et *-2*. Cette fois encore, des études plus approfondies seraient nécessaires afin de vérifier cette hypothèse. Il serait ainsi intéressant de vérifier la participation de JAK1 à l'activation de MAPK3/1 en inhibant la première kinase au moyen de petits ARN interférents préalablement à un traitement avec du LIF. La même stratégie pourrait permettre de statuer sur l'implication de JAK1 dans l'expression de CREB et GCMA et des *syncytines-1* et *-2*.

En bref, nos résultats soutiennent un rôle tant pour la voie MAPK3/1 MAP kinase que JAK/STAT dans la modulation du processus de fusion cellulaire induit par la forskoline et le LIF chez le modèle de CT utilisé, les cellules BeWo. Ces deux voies jouent un rôle commun et potentiellement complémentaire dans la potentialisation de l'effet de l'inducteur de l'adénylate cyclase.

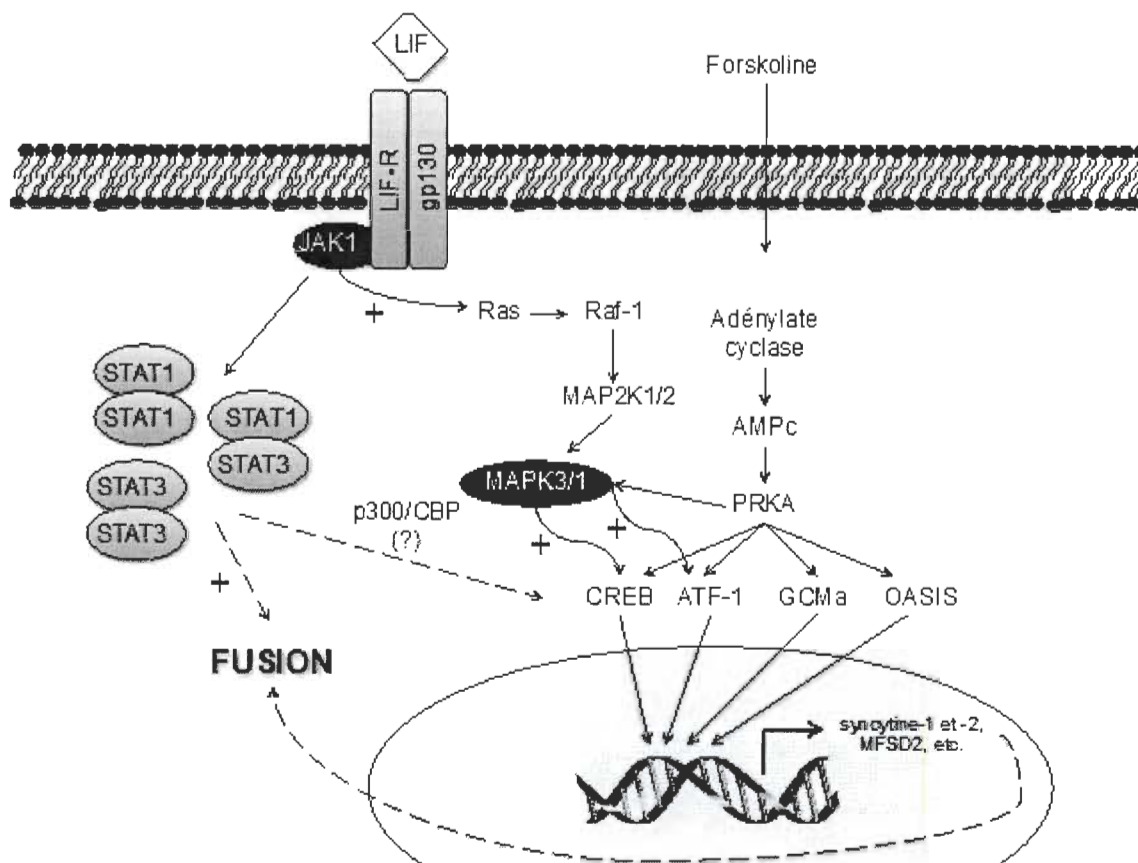


Figure 3.1 : Modèle moléculaire proposé de l'action du LIF sur la différenciation morphologique des cellules BeWo induite par la forskoline.

Les voies activées par le LIF pourraient agir de concert dans la régulation des gènes liés à la fusion, soit en induisant l'activation de facteurs de transcription (notamment CREB et GCMa), favorisant la fusion. Les dimères de STAT pourraient agir à titre de co-activateur de CREB en se liant à p300/CBP.

3.2 Le LIF et la sécrétion de β hCG

Nos résultats démontrent l'effet stimulant de la forskoline sur la différenciation biochimique des cellules BeWo, c'est-à-dire l'acquisition de la capacité à sécréter la β hCG. De manière inattendue, alors que le LIF stimule la fusion cellulaire, la cytokine se fait un inhibiteur de la sécrétion de l'hormone. Nos résultats nous permettent de proposer un mécanisme moléculaire par lequel le LIF pourrait réguler la différenciation biochimique, lequel est présenté à la figure 3.2. Bien qu'il soit reconnu que les deux axes de la différenciation des CT vont de pair, c'est-à-dire que la sécrétion de hCG démontre implicitement la fusion cellulaire, nos résultats suggèrent une régulation

distincte des deux phénomènes. Cette observation va dans le même sens que celles découlant d'une étude récente qui tend à démontrer l'absence de corrélation pure entre ces deux axes de la différenciation des CT en ST [150].

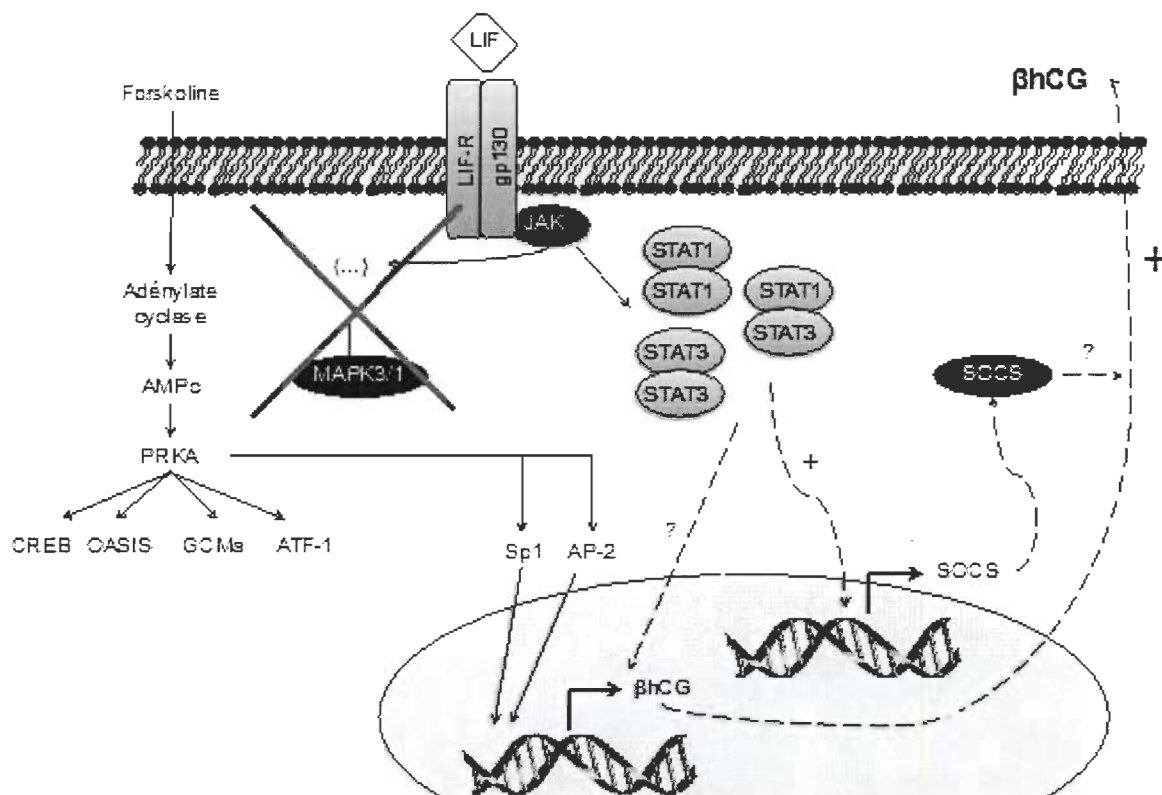


Figure 3.2 : Modèle moléculaire proposé de l'action du LIF sur la différenciation biochimique des cellules BeWo induite par la forskoline.

La voie MAPK3/1 MAP kinase n'est pas requise lors de la synthèse de la βhCG. Seule la voie JAK/STAT est responsable de l'effet inhibiteur du LIF sur la production hormonale. Les dimères de STAT pourraient réguler l'expression des gènes correspondant à la sous-unité β de l'hormone directement ou en interagissant avec des facteurs de transcription. Les STAT pourraient aussi réguler, via les SOCS, le processus de transport ou de dégradation protéolytique (via le protéasome) de l'hormone.

D'une part, nous avons démontré que la voie MAPK3/1 MAP kinase n'est pas un médiateur de l'action inhibitrice du LIF par rapport à la sécrétion de βhCG ni même un élément impliqué dans la sécrétion de l'hormone. En effet, l'inhibition de MAPK3/1 au moyen de l'inhibiteur de MAP2K1, le PD98059, conjointe à un traitement de forskoline s'est montrée inefficace à réduire la production hormonale (voir annexe A, figure A.1A).

De plus, les taux de β hCG obtenus suite à un traitement conjoint de forskoline et de LIF sont apparus être sensiblement les mêmes en absence ou en présence de cet inhibiteur (voir annexe A, figure A.1A) en dépit d'une réduction significative de la phosphorylation de MAPK3/1 lors d'un traitement avec l'inhibiteur. Il apparaît donc manifeste que l'activation de MAPK3/1 par la PRKA et que la participation de MAPK3/1 à l'activité de CREB ne soit bénéfique qu'à la fusion cellulaire. De même, ces résultats suggèrent une régulation différente pour la sécrétion de l'hormone et pour la fusion cellulaire, soit probablement via d'autres effecteurs finaux de la voie AMPc/PRKA dont l'activité n'est pas modulée par MAPK3/1. Sur ce point, les travaux de Albanese *et al.* [166] se montrent révélateurs, ceux-ci démontrant que CREB ne fait pas partie des facteurs de transcription se fixant aux éléments de réponse au sein du promoteur de la β hCG. Les facteurs de transcription AP-2 et Sp1 agissent de manière conjointe, se fixant à diverses régions promotrices précises afin de réguler la sécrétion basale et induite par l'AMPc [165]. Or, bien que AP-2 et Sp1 soient activés via la voie AMPc/PRKA [161, 165], aucune étude ne fait mention du potentiel activateur de MAPK3/1 à leur égard lors de la différenciation des trophoblastes, soutenant donc l'hypothèse d'un mécanisme de régulation différent pour la fusion et la sécrétion de β hCG. De surcroît, l'obtention de taux de β hCG similaires en absence ou présence de PD98059 lors d'un traitement conjoint de LIF et de forskoline démontre l'inefficacité de MAPK3/1 à moduler la production hormonale. En effet, le PD98059 réduit l'activation de MAPK3/1 de manière significative sans qu'une modification concrète ne soit détectable au niveau de la production hormonale. L'activation de cette kinase apparaît donc accessoire lors de la différenciation biochimique des cellules BeWo.

D'autre part, nous avons démontré que l'activation de la voie JAK/STAT est impliqué dans l'effet inhibiteur du LIF sur la sécrétion de β hCG. Comme pour la fusion cellulaire, le présent projet se révèle être la première étude à associer l'activation de cette voie à la modulation de l'activité endocrine des trophoblastes. Tel qu'observé lors de la fusion induite par la forskoline, nous avons observé que l'inhibiteur *JAK inhibitor I* ne modifie pas le potentiel stimulant de l'activateur de l'adénylate cyclase par rapport à la sécrétion hormonale (voir annexe A, figure A.1A). De plus, la forskoline ne semble

pas activer la voie JAK/STAT. Ces résultats suggèrent que l'activité des JAK ou STAT n'est pas requise lors de la synthèse de la protéine. L'ajout de LIF a toutefois permis l'activation de STAT1 et STAT3, laquelle est apparue inefficace à moduler la production hormonale en absence de forskoline, mais significativement inhibitrice en présence de ce même facteur. Il semble donc probable, pour cet aspect de la différenciation aussi, que l'action de la voie JAK/STAT régule l'activité de la voie AMPc/PRKA via une action sur les effecteurs finaux de la seconde plutôt qu'en interagissant avec les modules kinases. Dans cet ordre d'idées, il est connu que l'expression du groupe de six gènes de la β hCG est régulée de manière complexe via un réseau de divers facteurs de transcription se fixant à des motifs spécifiques au sein du promoteur. Or, la séquence du promoteur de la β hCG ne contient que peu d'éléments fournissant des indices concrets permettant une meilleure compréhension de la régulation de son expression. Quelques motifs au rôle crucial ont été identifiés, notamment des éléments de réponse à l'AMPc (motifs CRE) (-311 à -202) [166], des éléments spécifiques aux trophoblastes (*trophoblast-specific element* (TSE), -305 à -79), lesquels jouent un rôle dans la sécrétion basale de l'hormone [180], et des sites de liaison pour les facteurs AP-2 et Sp1 dont l'action est requise pour atteindre une activité maximale du promoteur [50]. AP-2, plus particulièrement, est activé en réponse à l'augmentation de l'AMPc [181] et est connu pour jouer un rôle central dans la l'expression de la β hCG [50] mais n'est pas impliqué dans la fusion des trophoblastes [182]. Ainsi, toute action de la voie JAK/STAT sur l'activité de AP-2, soit un effecteur final de la voie AMPc/PRKA, pourrait altérer la production de l'hormone sans toutefois altérer la formation du syncytium. La modification de l'activité de AP-2 pourrait ainsi se faire simplement via la fixation d'un homo- ou hétérodimère de STAT activés par le LIF directement au sein du promoteur de la β hCG. Cette liaison aurait pour effet de limiter l'activité de AP-2 et, du coup, du promoteur de la β hCG, ou encore de masquer un ou plusieurs sites de liaison de AP-2. De plus amples études visant à déterminer la présence d'éléments de réponse aux STAT dans le promoteur de l'hormone seraient nécessaires afin de vérifier cette hypothèse. Toutefois, il semble aussi probable qu'une interaction physique entre AP-2 et les dimères de STAT puisse être à l'origine d'une réduction de l'activité du premier facteur de transcription. Encore une fois, une étude plus

approfondie visant la détermination d'interactions protéine-protéine par co-immunoprécipitation s'avère nécessaire.

D'un autre point de vue, il serait aussi possible que STAT1 et/ou STAT3 agissent directement à titre d'inhibiteur de la sécrétion de la β hCG d'une manière similaire à celle décrite récemment par Chan *et al.*[183]. Ces auteurs ont démontré, chez les macrophages, que STAT3 réduit l'expression du gène de la cathepsine S dont l'activité protéolytique est requise dans le processus de présentation de l'antigène via le *major histocompatibility complex-II* (MHC-II). En effet, la cathepsine S clive un peptide au sein de la molécule *Human leukocyte antigen* (HLA)-DR avant qu'elle ne soit externalisée afin de jouer son rôle lors de la présentation de l'antigène [183]. Or, en réduisant l'expression de la cathepsine S, l'externalisation devient limitée, d'où une réduction de la présence du MHC-II à la surface des macrophages. Ainsi, dans le cadre de notre étude, il semble probable que STAT1 et/ou STAT3 inhibe l'expression d'un gène requis pour la sécrétion de la β hCG, notamment un intermédiaire nécessaire à la formation des vésicules contenant l'hormone à sécréter ou à sa fusion avec la membrane cellulaire.

À un autre niveau, il est aussi possible que la voie JAK/STAT régule, plutôt que l'expression génique, la dégradation d'effecteurs finaux de la voie AMPc/PRKA, notamment le facteur de transcription AP-2, d'où un effet inhibiteur. À ce titre, les protéines SOCS pourraient jouer un rôle clé dans ce processus. Brièvement, ces protéines préviennent une activation trop intense de la voie JAK/STAT. Cible directe des STAT, les gènes correspondant aux SOCS sont transcrits en réponse à l'activation de la voie JAK/STAT dont ils régulent négativement l'activité en se fixant soit directement aux JAK, soit au niveau d'un site sur le récepteur de cytokine limitant l'activité des JAK, soit en bloquant l'association des STAT avec le récepteur de cytokine [184]. L'action des SOCS ne se limite toutefois pas à la simple régulation négative de la voie JAK/STAT, mais semble plutôt participer à la dynamique et à la flexibilité des réponses de celle-ci. En effet, ces protéines peuvent moduler l'activation d'effecteurs en aval en se fixant de manière compétitive à des motifs contenant des

tyrosines phosphorylées et ainsi diriger plus précisément l'action des STAT [185]. De manière encore plus intéressante, les SOCS parviennent à réguler la transduction du signal en se faisant les médiateurs du processus d'ubiquitination qui, au final, peut aboutir à la dégradation des STAT via le protéasome [185]. Dans cet optique plus particulière, des analyses préliminaires ont démontré l'expression de l'ARNm de SOCS1 et SOCS3 en réponse au LIF chez les cellules BeWo (voir annexe A, figure A.2). Ainsi, puisque le *turnover* de AP-2 α est régulé par sa dégradation protéolytique via le protéasome et, nécessairement, via son ubiquitination [186], il apparaît que possible que les SOCS puissent procéder à la régulation de la production de β hCG via l'ubiquitination de AP-2 α . Ce facteur de transcription n'étant pas nécessaire à la fusion des CT [182], son ubiquitination aurait pour effet d'accélérer sa dégradation via le protéasome, résultant en une diminution marquée de la β hCG telle que nous avons observé, sans toutefois affecter la différenciation morphologique des cellules BeWo. La simple inhibition du protéasome au moyen, par exemple, de l'inhibiteur du protéasome MG132 [187] lors d'un traitement conjoint avec le LIF et la forskoline de la manière décrite dans l'article au chapitre deux permettrait de confirmer cette hypothèse. En effet, l'inhibition du protéasome devrait mener à une augmentation de la sécrétion de β hCG similaire à celle observée en présence de l'inhibiteur *JAK inhibitor 1* dans le cas où les SOCS se font des médiateurs de l'ubiquitination alors qu'aucune modification de l'effet du LIF ne serait remarquée dans la situation inverse.

CONCLUSION

À la lumière de nos résultats, il apparaît plus juste de considérer le mécanisme par lequel les CT acquièrent à la fois la capacité à fusionner et à sécréter la hCG en tant que deux processus se produisant de manière concomitante et parallèle sans qu'il n'y ait de dépendance absolue de l'un envers l'autre. Ces observations vont dans le même sens qu'une étude récente démontrant une régulation différente des deux axes de la différenciation des trophoblastes [150]. Nos résultats ajoutent donc quelques aspects nouveaux au modèle moléculaire de la différenciation des cellules BeWo en réponse à la forskoline présenté au début de cette section. Alors que la principale voie de signalisation cellulaire régulant la différenciation est la voie AMPc/PRKA, la voie JAK/STAT apparaît jouer un rôle important à titre de régulateur de l'action de la première. Cette régulation apparaît pouvoir se faire via des interactions entre les dimères de STAT et des effecteurs finaux (AP-2 ou CREB, par exemple) de la voie AMPc/PRKA. Cependant, elle pourrait aussi agir à titre de régulateur indirect de la voie AMPc/PRKA et MAPK3/1. En effet, devant les liens moléculaires unissant les voies AMPc/PRKA et MAPK3/1 MAP kinase, il semble que ces deux voies agissent de manière conjointe dans la régulation de la différenciation des cellules BeWo, l'une apparaissant pouvoir compenser la faible activation de l'autre. Cependant, des études suggèrent que JAK1 peut réguler la phosphorylation de MAPK3/1, donc que JAK1 peut aussi moduler l'activation des intermédiaires de la voie AMPc/PRKA à laquelle MAPK3/1 peut participer (notamment CREB).

Le but visé par ce projet étant essentiellement la description de l'effet du LIF et des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans son action au niveau de la fusion et de la sécrétion de β hCG, le ou les points d'action précis du LIF n'ont pas été plus amplement investigués. Cependant, à la lumière des résultats que nous avons obtenus, il apparaît manifeste que des analyses supplémentaires sont requises afin de mieux comprendre, dans un premier temps, les acteurs moléculaires précis impliqués dans la transduction du signal du LIF via la voie JAK/STAT chez les cellules BeWo. Les effets divergents du LIF quant aux deux aspects de la syncytialisation semblent

principalement gouvernés via la voie JAK/STAT, l'inhibition de celle-ci ayant mené à une altération des effets de la cytokine. L'approche expérimentale employée, soit l'inhibition chimique au moyen du *JAK inhibitor I*, ne permet pas de déterminer avec précision quel(s) JAK ni quel(s) STAT parvient efficacement à moduler la fusion cellulaire et/ou la sécrétion de β hCG. En lien avec des travaux menés chez la souris, il semble fort probable que la voie employée par le LIF implique JAK1 de manière préférentielle [188], quoique JAK2 et TYK2 soient aussi connus pour interagir avec la sous-unité IL6ST du récepteur du LIF [94]. Il serait donc intéressant de poursuivre les études visant l'élucidation du mécanisme du LIF en déterminant plus précisément l'implication de JAK1, JAK2 et TYK2 dans la transmission du signal du LIF, notamment au moyen d'une approche plus spécifique via l'utilisation de petits ARN interférents. En accord avec d'autres études chez les CT [33, 75, 101], nous avons aussi démontré que STAT1 et STAT3 sont activés en réponse au LIF. Alors que ces deux facteurs de transcription sont connus pour avoir un rôle dans l'invasion des CTEV [33, 75, 101, 106], nous avons déterminé leur implication dans l'acquisition des fonctions endocrines et des capacités de fusion de cellules BeWo, décrivant un rôle jusqu'ici inconnu de cette voie. Ces données permettent d'ajouter à la pléiotropie de l'action de la voie JAK/STAT, mais représente surtout une piste nouvelle dans la compréhension du complexe programme moléculaire de la syncytialisation.

Dans un deuxième temps, les travaux présentés ici permettent de mieux décrire le mécanisme à l'origine des effets divergents de la cytokine sur les deux aspects de la différenciation des cellules BeWo. Le manque de connaissances quant à la régulation moléculaire des deux axes de la différenciation de ces cellules rend difficile l'attribution précise des rôles de chacune des voies de signalisation étudiées ici. Il semble toutefois que quelques études récentes soutiennent l'indépendance ou, du moins, l'absence de dépendance nette entre les phénomènes de fusion cellulaire et de sécrétion de β hCG [150]. De même, l'ambiguïté entourant l'action du LIF quant à la sécrétion de β hCG, à la fois rapportée comme étant stimulante [20] et inhibitrice [19], ne permet que de supposer à une régulation dynamique évoluant dans le temps et, nécessairement, de manière concomitante à un ensemble de phénomènes liés à la grossesse. La poursuite

des présents travaux s'avèrerait donc plus spécifique à l'élucidation des composantes moléculaires à l'origine de la régulation de la β hCG. Ceci serait fait dans l'optique de vérifier, d'abord, s'il existe un lien de dépendance entre la capacité des cellules BeWo à sécréter la β hCG et leur habileté à fusionner.

En définitive, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet définissent de manière plus large le rôle du LIF qui pourrait jouer un rôle important non seulement lors de l'implantation embryonnaire, mais aussi lors de l'initiation de la formation du placenta par son implication dans la différenciation des CT en ST. La validation de nos résultats obtenus à partir d'un modèle cellulaire (cellules BeWo) chez une culture primaire de CT permettrait de confirmer ces données dans un contexte physiologique. De même, considérant que le LIF permet de moduler la différenciation morphologique et biochimique des CT, il serait intéressant de considérer l'éventuelle utilisation de la cytokine dans un but thérapeutique. Il est bien connu que la formation du placenta dans des cas de grossesses affectées par la trisomie-21 ne parvient pas à se former normalement en raison d'une dysfonction de la différenciation des CT en ST [43, 46] dont la cause est inconnue. En effet, le ST est souvent peu développé et n'offre qu'une faible surface d'échange [46], ce qui augmente les risques de complications telles la restriction de la croissance intrautérine, la naissance prématurée et peut, dans les cas les plus sévères, engendrer la mort du fœtus [53]. De plus, le taux sérique de β hCG lors du deuxième trimestre est nettement augmenté en comparaison aux grossesses normales [189]. Le LIF parvenant à stimuler la fusion, mais réduisant la production de l'hormone, il semble que cette cytokine pourrait limiter les conséquences adverses d'un défaut de la formation du syncytium lié à la trisomie-21. En effet, la cytokine pourrait potentiellement restaurer les capacités des CT à fusionner afin de former le ST, augmentant la surface disponible pour les échanges fœto-maternels. De même, le LIF pourrait réduire la sécrétion de la β hCG par les ST, permettant de retrouver des valeurs normales. Sans traiter la source de la maladie, un traitement avec du LIF pourrait néanmoins résulter en une restauration partielle des fonctions placentaires facilitant le développement du fœtus et réduisant les risques de complications associées à la trisomie-21.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dutta-Roy, A.K., *Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty-acid-binding/transport proteins*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2000. **57**(10): p. 1360-72.
2. Anthony, R.V., S.L. Pratt, R. Liang, and M.D. Holland, *Placental-fetal hormonal interactions: impact on fetal growth*. J Anim Sci, 1995. **73**(6): p. 1861-71.
3. Guibourdenche, J., T. Fournier, A. Malassine, and D. Evain-Brion, *Development and hormonal functions of the human placenta*. Folia Histochem Cytobiol, 2009. **47**(5): p. S35-40.
4. Carter, A.M., *Evolution of factors affecting placental oxygen transfer*. Placenta, 2009. **30 Suppl A**: p. S19-25.
5. Macias, R.I., J.J. Marin, and M.A. Serrano, *Excretion of biliary compounds during intrauterine life*. World journal of gastroenterology : WJG, 2009. **15**(7): p. 817-28.
6. Mor, G. and I. Cardenas, *The immune system in pregnancy: a unique complexity*. American journal of reproductive immunology, 2010. **63**(6): p. 425-33.
7. Evain-Brion, D., *[The 2 differentiation pathways of the human trophoblast]*. Gynecol Obstet Fertil, 2001. **29**(7-8): p. 497-502.
8. Handwerger, S. and B. Aronow, *Dynamic changes in gene expression during human trophoblast differentiation*. Recent Prog Horm Res, 2003. **58**: p. 263-81.
9. Malassine, A. and L. Cronier, *Hormones and human trophoblast differentiation: a review*. Endocrine, 2002. **19**(1): p. 3-11.
10. Kayisli, U.A., B. Selam, O. Guzeloglu-Kayisli, R. Demir, and A. Arici, *Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system*. J Immunol, 2003. **171**(5): p. 2305-13.

11. Gearing, D.P., N.M. Gough, J.A. King, D.J. Hilton, N.A. Nicola, R.J. Simpson, E.C. Nice, A. Kelso, and D. Metcalf, *Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF)*. EMBO J, 1987. **6**(13): p. 3995-4002.
12. Stewart, C.L., P. Kaspar, L.J. Brunet, H. Bhatt, I. Gadi, F. Kontgen, and S.J. Abbondanzo, *Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor*. Nature, 1992. **359**(6390): p. 76-9.
13. Arici, A., O. Engin, E. Attar, and D.L. Olive, *Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(6): p. 1908-15.
14. Charnock-Jones, D.S., A.M. Sharkey, P. Fenwick, and S.K. Smith, *Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time*. J Reprod Fertil, 1994. **101**(2): p. 421-6.
15. Chen, D.B., R. Hilsenrath, Z.M. Yang, S.P. Le, S.R. Kim, C.J. Chuong, A.N. Poindexter, 3rd, and M.J. Harper, *Leukaemia inhibitory factor in human endometrium during the menstrual cycle: cellular origin and action on production of glandular epithelial cell prostaglandin in vitro*. Hum Reprod, 1995. **10**(4): p. 911-8.
16. Aghajanova, L., *Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1034**: p. 176-83.
17. Kojima, K., H. Kanzaki, M. Iwai, H. Hatayama, M. Fujimoto, S. Narukawa, T. Higuchi, Y. Kaneko, T. Mori, and J. Fujita, *Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts*. Hum Reprod, 1995. **10**(7): p. 1907-11.
18. Sharkey, A.M., A. King, D.E. Clark, T.D. Burrows, P.P. Jokhi, D.S. Charnock-Jones, Y.W. Loke, and S.K. Smith, *Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy*. Biol Reprod, 1999. **60**(2): p. 355-64.
19. Nachtigall, M.J., H.J. Kliman, R.F. Feinberg, D.L. Olive, O. Engin, and A. Arici, *The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation: a potential role in human implantation*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(2): p. 801-6.

20. Sawai, K., C. Azuma, M. Koyama, S. Ito, K. Hashimoto, T. Kimura, Y. Samejima, T. Nobunaga, and F. Saji, *Leukemia inhibitory factor (LIF) enhances trophoblast differentiation mediated by human chorionic gonadotropin (hCG)*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **211**(1): p. 137-43.
21. Maltepe, E., A.I. Bakardjiev, and S.J. Fisher, *The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development*. The Journal of clinical investigation, 2010. **120**(4): p. 1016-25.
22. Reynolds, L.P. and D.A. Redmer, *Utero-placental vascular development and placental function*. J Anim Sci, 1995. **73**(6): p. 1839-51.
23. Demir, R., P. Kaufmann, M. Castellucci, T. Erben, and A. Kotowski, *Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi*. Acta Anat (Basel), 1989. **136**(3): p. 190-203.
24. Morrish, D.W., J. Dakour, and H. Li, *Life and death in the placenta: new peptides and genes regulating human syncytiotrophoblast and extravillous cytotrophoblast lineage formation and renewal*. Curr Protein Pept Sci, 2001. **2**(3): p. 245-59.
25. Naidu, M., V. Nama, M. Karoshi, V. Kakumani, and R. Worth, *Umbilical cord rupture: a case report and review of literature*. International journal of fertility and women's medicine, 2007. **52**(2-3): p. 107-10.
26. Mihu, C.M., S. Susman, D. Rus Ciuca, D. Mihu, and N. Costin, *Aspects of placental morphogenesis and angiogenesis*. Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie, 2009. **50**(4): p. 549-57.
27. Cartwright, J.E., R. Fraser, K. Leslie, A.E. Wallace, and J.L. James, *Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders*. Reproduction, 2010. **140**(6): p. 803-13.
28. Maruyama, T. and Y. Yoshimura, *Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium*. Endocrine journal, 2008. **55**(5): p. 795-810.
29. Robbins, J.R., K.M. Skrzypczynska, V.B. Zeldovich, M. Kapidzic, and A.I. Bakardjiev, *Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of Listeria monocytogenes*. PLoS pathogens, 2010. **6**(1): p. e1000732.

30. Aplin, J.D., *Developmental cell biology of human villous trophoblast: current research problems*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(2-3): p. 323-9.
31. Mayhew, T.M., *Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation*. Histology and histopathology, 2001. **16**(4): p. 1213-24.
32. Redman, C.W. and I.L. Sargent, *Microparticles and immunomodulation in pregnancy and pre-eclampsia*. J Reprod Immunol, 2007. **76**(1-2): p. 61-7.
33. Fitzgerald, J.S., T.G. Poehlmann, E. Schleussner, and U.R. Markert, *Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)*. Hum Reprod Update, 2008. **14**(4): p. 33-544.
34. Lunghi, L., M.E. Ferretti, S. Medici, C. Biondi, and F. Vesce, *Control of human trophoblast function*. Reprod Biol Endocrinol, 2007. **5**: p. 6.
35. Mutter, W.P. and S.A. Karumanchi, *Molecular mechanisms of preeclampsia*. Microvasc Res, 2008. **75**(1): p. 1-8.
36. Pollheimer, J. and M. Knofler, *Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review*. Placenta, 2005. **26 Suppl A**: p. S21-30.
37. Zhou, Y., C.H. Damsky, and S.J. Fisher, *Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome?* J Clin Invest, 1997. **99**(9): p. 2152-64.
38. Kaufmann, P., S. Black, and B. Huppertz, *Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia*. Biology of reproduction, 2003. **69**(1): p. 1-7.
39. Forbes, K. and M. Westwood, *Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth*. J Endocrinol, 2010. **207**(1): p. 1-16.
40. Richart, R., *Studies of placental morphogenesis. I. Radioautographic studies of human placenta utilizing tritiated thymidine*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine, 1961. **106**: p. 829-31.

41. Huppertz, B., H.G. Frank, F. Reister, J. Kingdom, H. Korr, and P. Kaufmann, *Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1999. **79**(12): p. 1687-702.
42. Potgens, A.J., U. Schmitz, P. Bose, A. Versmold, P. Kaufmann, and H.G. Frank, *Mechanisms of syncytial fusion: a review*. Placenta, 2002. **23 Suppl A**: p. S107-13.
43. Malassine, A., J.L. Frendo, and D. Evain-Brion, *Trisomy 21- affected placentas highlight prerequisite factors for human trophoblast fusion and differentiation*. The International journal of developmental biology, 2010. **54**(2-3): p. 475-82.
44. Getsios, S., G.T. Chen, and C.D. MacCalman, *Regulation of beta-catenin mRNA and protein levels in human villous cytotrophoblasts undergoing aggregation and fusion in vitro: correlation with E-cadherin expression*. Journal of reproduction and fertility, 2000. **119**(1): p. 59-68.
45. Coutifaris, C., L.C. Kao, H.M. Sehdev, U. Chin, G.O. Babalola, O.W. Blaschuk, and J.F. Strauss, 3rd, *E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts*. Development, 1991. **113**(3): p. 767-77.
46. Malassine, A., G. Pidoux, P. Gerbaud, J.L. Frendo, and D. Evain-Brion, *Human trophoblast in trisomy 21: a model for cell-cell fusion dynamic investigation*. Advances in experimental medicine and biology, 2011. **714**: p. 103-12.
47. Frendo, J.L., D. Olivier, V. Cheynet, J.L. Blond, O. Bouton, M. Vidaud, M. Rabreau, D. Evain-Brion, and F. Mallet, *Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation*. Molecular and cellular biology, 2003. **23**(10): p. 3566-74.
48. Vargas, A., J. Moreau, S. Landry, F. LeBellego, C. Toufaily, E. Rassart, J. Lafond, and B. Barbeau, *Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells*. Journal of molecular biology, 2009. **392**(2): p. 301-18.
49. Zygmont, M., F. Herr, S. Keller-Schoenwetter, K. Kunzi-Rapp, K. Munstedt, C.V. Rao, U. Lang, and K.T. Preissner, *Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 2002. **87**(11): p. 5290-6.

50. Knofler, M., L. Saleh, S. Bauer, B. Galos, H. Rotheneder, P. Husslein, and H. Helmer, *Transcriptional regulation of the human chorionic gonadotropin beta gene during villous trophoblast differentiation*. *Endocrinology*, 2004. **145**(4): p. 1685-94.
51. Cole, L.A., *New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009. **7**: p. 8.
52. Frendo, J.L., M. Vidaud, J. Guibourdenche, D. Luton, F. Muller, D. Bellet, Y. Giovagrandi, A. Tarrade, D. Porquet, P. Blot, and D. Evain-Brion, *Defect of villous cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast in Down's syndrome*. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2000. **85**(10): p. 3700-7.
53. Krantz, D., L. Goetzl, J.L. Simpson, E. Thom, J. Zachary, T.W. Hallahan, R. Silver, E. Pergament, L.D. Platt, K. Filkins, A. Johnson, M. Mahoney, W.A. Hogge, R.D. Wilson, P. Mohide, D. Hershey, and R. Wapner, *Association of extreme first-trimester free human chorionic gonadotropin-beta, pregnancy-associated plasma protein A, and nuchal translucency with intrauterine growth restriction and other adverse pregnancy outcomes*. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2004. **191**(4): p. 1452-8.
54. Massin, N., J.L. Frendo, J. Guibourdenche, D. Luton, Y. Giovagrandi, F. Muller, M. Vidaud, and D. Evain-Brion, *Defect of syncytiotrophoblast formation and human chorionic gonadotropin expression in Down's syndrome*. *Placenta*, 2001. **22 Suppl A**: p. S93-7.
55. Cronier, L., B. Bastide, J.C. Herve, J. Deleze, and A. Malassine, *Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin*. *Endocrinology*, 1994. **135**(1): p. 402-8.
56. Shi, Q.J., Z.M. Lei, C.V. Rao, and J. Lin, *Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts*. *Endocrinology*, 1993. **132**(3): p. 1387-95.
57. Licht, P., H. Cao, Z.M. Lei, C.V. Rao, and W.E. Merz, *Novel self-regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in term pregnancy human placenta*. *Endocrinology*, 1993. **133**(6): p. 3014-25.
58. Fitzgerald, B., K. Levytska, J. Kingdom, M. Walker, D. Baczyk, and S. Keating, *Villous trophoblast abnormalities in extremely preterm deliveries with elevated second trimester maternal serum hCG or inhibin-A*. *Placenta*, 2011. **32**(4): p. 339-45.

59. Kirkegaard, I., T.B. Henriksen, and N. Uldbjerg, *Early fetal growth, PAPP-A and free beta-hCG in relation to risk of delivering a small-for-gestational age infant*. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 2011. **37**(3): p. 341-7.
60. Jurkovic, D., *hCG as a patient*. *Ultrasound in obstetrics & gynecology: the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 2010. **36**(4): p. 395-9.
61. Chang, C.W., H.C. Chuang, C. Yu, T.P. Yao, and H. Chen, *Stimulation of GCMA transcriptional activity by cyclic AMP/protein kinase A signaling is attributed to CBP-mediated acetylation of GCMA*. *Molecular and cellular biology*, 2005. **25**(19): p. 8401-14.
62. Daoud, G., M. Amyot, E. Rassart, A. Masse, L. Simoneau, and J. Lafond, *ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta*. *J Physiol*, 2005. **566**(Pt 2): p. 409-23.
63. Daoud, G., F. Le bellego, and J. Lafond, *PP2 regulates human trophoblast cells differentiation by activating p38 and ERK1/2 and inhibiting FAK activation*. *Placenta*, 2008. **29**(10): p. 862-70.
64. Daoud, G., E. Rassart, A. Masse, and J. Lafond, *Src family kinases play multiple roles in differentiation of trophoblasts from human term placenta*. *J Physiol*, 2006. **571**(Pt 3): p. 537-53.
65. Delidakis, M., M. Gu, A. Hein, M. Vatish, and D.K. Grammatopoulos, *Interplay of cAMP and MAPK pathways in hCG secretion and fusogenic gene expression in a trophoblast cell line*. *Mol Cell Endocrinol*, 2010.
66. Hatano, N., Y. Mori, M. Oh-hora, A. Kosugi, T. Fujikawa, N. Nakai, H. Niwa, J. Miyazaki, T. Hamaoka, and M. Ogata, *Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development*. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 2003. **8**(11): p. 847-56.
67. Kita, N., J. Mitsushita, S. Ohira, Y. Takagi, T. Ashida, M. Kanai, T. Nikaido, and I. Konishi, *Expression and activation of MAP kinases, ERK1/2, in the human villous trophoblasts*. *Placenta*, 2003. **24**(2-3): p. 164-72.

68. Knerr, I., S.W. Schubert, C. Wich, K. Amann, T. Aigner, T. Vogler, R. Jung, J. Dotsch, W. Rascher, and S. Hashemolhosseini, *Stimulation of GCMA and syncytin via cAMP mediated PKA signaling in human trophoblastic cells under normoxic and hypoxic conditions*. FEBS letters, 2005. **579**(18): p. 3991-8.
69. Johnstone, E.D., C.P. Sibley, B. Lowen, and L.J. Guilbert, *Epidermal growth factor stimulation of trophoblast differentiation requires MAPK11/14 (p38 MAP kinase) activation*. Biology of reproduction, 2005. **73**(6): p. 1282-8.
70. Morrish, D.W., J. Dakour, and H. Li, *Functional regulation of human trophoblast differentiation*. J Reprod Immunol, 1998. **39**(1-2): p. 179-95.
71. Garcia-Lloret, M.I., D.W. Morrish, T.G. Wegmann, L. Honore, A.R. Turner, and L.J. Guilbert, *Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CSF-1 and GM-CSF stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion*. Experimental cell research, 1994. **214**(1): p. 46-54.
72. Forbes, K., M. Westwood, P.N. Baker, and J.D. Aplin, *Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblast in the developing human placenta*. American journal of physiology. Cell physiology, 2008. **294**(6): p. C1313-22.
73. Dimitriadis, E., C.A. White, R.L. Jones, and L.A. Salamonsen, *Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation*. Hum Reprod Update, 2005. **11**(6): p. 613-30.
74. Graham, C.H., J.J. Lysiak, K.R. McCrae, and P.K. Lala, *Localization of transforming growth factor-beta at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation*. Biology of reproduction, 1992. **46**(4): p. 561-72.
75. Poehlmann, T.G., J.S. Fitzgerald, A. Meissner, T. Wengenmayer, E. Schleussner, K. Friedrich, and U.R. Markert, *Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3*. Placenta, 2005. **26 Suppl A**: p. S37-41.
76. Kamei, T., S.R. Jones, B.M. Chapman, M.C. KL, G. Dai, and M.J. Soares, *The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway modulates the endocrine differentiation of trophoblast cells*. Molecular endocrinology, 2002. **16**(7): p. 1469-81.
77. Kent, L.N., T. Konno, and M.J. Soares, *Phosphatidylinositol 3 kinase modulation of trophoblast cell differentiation*. BMC developmental biology, 2010. **10**: p. 97.

78. Fitzgerald, J.S., A. Germeyer, B. Huppertz, U. Jeschke, M. Knofler, G. Moser, C. Scholz, S. Sonderegger, B. Toth, and U.R. Markert, *Governing the invasive trophoblast: current aspects on intra- and extracellular regulation*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 492-505.
79. Kolch, W., *Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions*. The Biochemical journal, 2000. **351 Pt 2**: p. 289-305.
80. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. Physiological reviews, 2001. **81**(2): p. 807-69.
81. Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B.E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M.H. Cobb, *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. Endocrine reviews, 2001. **22**(2): p. 153-83.
82. Widmann, C., S. Gibson, M.B. Jarpe, and G.L. Johnson, *Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human*. Physiological reviews, 1999. **79**(1): p. 143-80.
83. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 2004. **68**(2): p. 320-44.
84. van Drogen, F. and M. Peter, *MAP kinase cascades: scaffolding signal specificity*. Current biology : CB, 2002. **12**(2): p. R53-5.
85. Pages, G., S. Guerin, D. Grall, F. Bonino, A. Smith, F. Anjuere, P. Auberger, and J. Pouyssegur, *Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1374-7.
86. Park, M.H., S.M. Lee, J.W. Lee, D.J. Son, D.C. Moon, D.Y. Yoon, and J.T. Hong, *ERK-mediated production of neurotrophic factors by astrocytes promotes neuronal stem cell differentiation by erythropoietin*. Biochemical and biophysical research communications, 2006. **339**(4): p. 1021-8.
87. Chen, Y., I. Amende, T.G. Hampton, Y. Yang, Q. Ke, J.Y. Min, Y.F. Xiao, and J.P. Morgan, *Vascular endothelial growth factor promotes cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells*. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 2006. **291**(4): p. H1653-8.

88. Campbell, S.L., R. Khosravi-Far, K.L. Rossman, G.J. Clark, and C.J. Der, *Increasing complexity of Ras signaling*. *Oncogene*, 1998. **17**(11 Reviews): p. 1395-413.
89. Cutler, R.E., Jr., R.M. Stephens, M.R. Saracino, and D.K. Morrison, *Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. **95**(16): p. 9214-9.
90. Saba-El-Leil, M.K., F.D. Vella, B. Vernay, L. Voisin, L. Chen, N. Labrecque, S.L. Ang, and S. Meloche, *An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development*. *EMBO reports*, 2003. **4**(10): p. 964-8.
91. Knofler, M., *Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion*. *Int J Dev Biol*, 2010. **54**(2-3): p. 269-80.
92. Cohen, M., A. Meisser, and P. Bischof, *Metalloproteinases and human placental invasiveness*. *Placenta*, 2006. **27**(8): p. 783-93.
93. Prast, J., L. Saleh, H. Husslein, S. Sonderegger, H. Helmer, and M. Knofler, *Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling*. *Endocrinology*, 2008. **149**(3): p. 979-87.
94. Heinrich, P.C., I. Behrmann, S. Haan, H.M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper, *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. *Biochem J*, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
95. Rawlings, J.S., K.M. Rosler, and D.A. Harrison, *The JAK/STAT signaling pathway*. *Journal of cell science*, 2004. **117**(Pt 8): p. 1281-3.
96. Maj, T. and A. Chelmonska-Soyta, *Pleiotropy and redundancy of STAT proteins in early pregnancy*. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 2007. **42**(4): p. 343-53.
97. Pellegrini, S. and I. Dusanter-Fourt, *The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs)*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 1997. **248**(3): p. 615-33.
98. Lim, C.P. and X. Cao, *Structure, function, and regulation of STAT proteins*. *Mol Biosyst*, 2006. **2**(11): p. 536-50.

99. Leaman, D.W., S. Leung, X. Li, and G.R. Stark, *Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines*. The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1996. **10**(14): p. 1578-88.
100. Ivashkiv, L.B. and X. Hu, *Signaling by STATs*. Arthritis research & therapy, 2004. **6**(4): p. 159-68.
101. Fitzgerald, J.S., S.A. Tsareva, T.G. Poehlmann, L. Berod, A. Meissner, F.M. Corvinus, B. Wiederanders, E. Pfitzner, U.R. Markert, and K. Friedrich, *Leukemia inhibitory factor triggers activation of signal transducer and activator of transcription 3, proliferation, invasiveness, and altered protease expression in choriocarcinoma cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(11): p. 2284-96.
102. Ware, C.B., M.C. Horowitz, B.R. Renshaw, J.S. Hunt, D. Liggitt, S.A. Koblar, B.C. Gliniak, H.J. McKenna, T. Papayannopoulou, B. Thoma, and et al., *Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death*. Development, 1995. **121**(5): p. 1283-99.
103. Antczak, M. and J. Van Blerkom, *Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo*. Mol Hum Reprod, 1997. **3**(12): p. 1067-86.
104. Teng, C.B., H.L. Diao, H. Ma, J. Cong, H. Yu, X.H. Ma, L.B. Xu, and Z.M. Yang, *Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) expression and activation in rat uterus during early pregnancy*. Reproduction, 2004. **128**(2): p. 197-205.
105. Takeda, K., K. Noguchi, W. Shi, T. Tanaka, M. Matsumoto, N. Yoshida, T. Kishimoto, and S. Akira, *Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(8): p. 3801-4.
106. Corvinus, F.M., J.S. Fitzgerald, K. Friedrich, and U.R. Markert, *Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity*. Am J Reprod Immunol, 2003. **50**(4): p. 316-21.
107. Goldberg, G.I., A. Strongin, I.E. Collier, L.T. Genrich, and B.L. Marmer, *Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin*. The Journal of biological chemistry, 1992. **267**(7): p. 4583-91.

108. Librach, C.L., Z. Werb, M.L. Fitzgerald, K. Chiu, N.M. Corwin, R.A. Esteves, D. Grobelyny, R. Galardy, C.H. Damsky, and S.J. Fisher, *92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts*. The Journal of cell biology, 1991. **113**(2): p. 437-49.
109. Tapia, A., L.A. Salamonsen, U. Manuelpillai, and E. Dimitriadis, *Leukemia inhibitory factor promotes human first trimester extravillous trophoblast adhesion to extracellular matrix and secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2*. Hum Reprod, 2008. **23**(8): p. 1724-32.
110. Haines, B.P., R.B. Voyle, and P.D. Rathjen, *Intracellular and extracellular leukemia inhibitory factor proteins have different cellular activities that are mediated by distinct protein motifs*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(4): p. 1369-83.
111. Kondera-Anasz, Z., J. Sikora, and A. Mielczarek-Palacz, *Leukemia inhibitory factor: an important regulator of endometrial function*. Am J Reprod Immunol, 2004. **52**(2): p. 97-105.
112. Hilton, D.J. and N.M. Gough, *Leukemia inhibitory factor: a biological perspective*. J Cell Biochem, 1991. **46**(1): p. 21-6.
113. Hilton, D.J., N.A. Nicola, and D. Metcalf, *Specific binding of murine leukemia inhibitory factor to normal and leukemic monocytic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(16): p. 5971-5.
114. Leary, A.G., G.G. Wong, S.C. Clark, A.G. Smith, and M. Ogawa, *Leukemia inhibitory factor differentiation-inhibiting activity/human interleukin for DA cells augments proliferation of human hematopoietic stem cells*. Blood, 1990. **75**(10): p. 1960-4.
115. Verfaillie, C. and P. McGlave, *Leukemia inhibitory factor/human interleukin for DA cells: a growth factor that stimulates the in vitro development of multipotential human hematopoietic progenitors*. Blood, 1991. **77**(2): p. 263-70.
116. Schaafsma, M.R., J.H. Falkenburg, N. Duinkerken, J.F. Moreau, J.P. Soulillou, R. Willemze, and W.E. Fibbe, *Human interleukin for DA cells (HILDA) does not affect the proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells in human long-term bone marrow cultures*. Exp Hematol, 1992. **20**(1): p. 6-10.
117. Metcalf, D., N.A. Nicola, and D.P. Gearing, *Effects of injected leukemia inhibitory factor on hematopoietic and other tissues in mice*. Blood, 1990. **76**(1): p. 50-6.

118. Mayer, P., K. Geissler, M. Ward, and D. Metcalf, *Recombinant human leukemia inhibitory factor induces acute phase proteins and raises the blood platelet counts in nonhuman primates*. *Blood*, 1993. **81**(12): p. 3226-33.
119. Williams, R.L., D.J. Hilton, S. Pease, T.A. Willson, C.L. Stewart, D.P. Gearing, E.F. Wagner, D. Metcalf, N.A. Nicola, and N.M. Gough, *Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells*. *Nature*, 1988. **336**(6200): p. 684-7.
120. Smith, A.G., J.K. Heath, D.D. Donaldson, G.G. Wong, J. Moreau, M. Stahl, and D. Rogers, *Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides*. *Nature*, 1988. **336**(6200): p. 688-90.
121. Thomson, J.A., J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, and J.M. Jones, *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. *Science*, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
122. Metcalf, D. and D.P. Gearing, *Fatal syndrome in mice engrafted with cells producing high levels of the leukemia inhibitory factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(15): p. 5948-52.
123. Reid, L.R., C. Lowe, J. Cornish, S.J. Skinner, D.J. Hilton, T.A. Willson, D.P. Gearing, and T.J. Martin, *Leukemia inhibitory factor: a novel bone-active cytokine*. *Endocrinology*, 1990. **126**(3): p. 1416-20.
124. Chesnokova, V., A. Kariagina, and S. Melmed, *Opposing effects of pituitary leukemia inhibitory factor and SOCS-3 on the ACTH axis response to inflammation*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. **282**(5): p. E1110-8.
125. Tomida, M., U. Yoshida, C. Mogi, M. Maruyama, H. Goda, Y. Hatta, and K. Inoue, *Leukaemia inhibitory factor and interleukin 6 inhibit secretion of prolactin and growth hormone by rat pituitary MtT/SM cells*. *Cytokine*, 2001. **14**(4): p. 202-7.
126. Nilsson, E.E., P. Kezele, and M.K. Skinner, *Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries*. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. **188**(1-2): p. 65-73.
127. Piquet-Pellorce, C., I. Dorval-Coiffec, M.D. Pham, and B. Jegou, *Leukemia inhibitory factor expression and regulation within the testis*. *Endocrinology*, 2000. **141**(3): p. 1136-41.

128. Sariola, H., *The neurotrophic factors in non-neuronal tissues*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(8): p. 1061-6.
129. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
130. Heinrich, P.C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve, *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. The Biochemical journal, 1998. **334** (Pt 2): p. 297-314.
131. Prakash, G.J., P. Suman, D.M. Prieto, U.R. Markert, and S.K. Gupta, *Leukaemia inhibitory factor mediated proliferation of HTR-8/SVneo trophoblast cells is dependent on activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2*. Reproduction, fertility, and development, 2011. **23**(5): p. 714-24.
132. Fitzgerald, J.S., B. Toth, U. Jeschke, E. Schleussner, and U.R. Markert, *Knocking off the suppressors of cytokine signaling (SOCS): their roles in mammalian pregnancy*. Journal of reproductive immunology, 2009. **83**(1-2): p. 117-23.
133. Larsen, L. and C. Ropke, *Suppressors of cytokine signalling: SOCS*. APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, 2002. **110**(12): p. 833-44.
134. Magni, P., E. Dozio, M. Ruscica, H. Watanobe, A. Cariboni, R. Zaninetti, M. Motta, and R. Maggi, *Leukemia inhibitory factor induces the chemomigration of immortalized gonadotropin-releasing hormone neurons through the independent activation of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3, mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated kinase 1/2, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways*. Molecular endocrinology, 2007. **21**(5): p. 1163-74.
135. Zhao, L., S. Hart, J. Cheng, J.J. Melenhorst, B. Bieri, M. Ernst, C. Stewart, F. Schaper, P.C. Heinrich, A. Ullrich, G.W. Robinson, and L. Hennighausen, *Mammary gland remodeling depends on gp130 signaling through Stat3 and MAPK*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(42): p. 44093-100.
136. Takahashi-Tezuka, M., Y. Yoshida, T. Fukada, T. Ohtani, Y. Yamanaka, K. Nishida, K. Nakajima, M. Hibi, and T. Hirano, *Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase*. Molecular and cellular biology, 1998. **18**(7): p. 4109-17.

137. Schiemann, W.P., J.L. Bartoe, and N.M. Nathanson, *Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor alpha- and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase. Evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at Ras.* The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(26): p. 16631-6.
138. Li, M., M. Sendtner, and A. Smith, *Essential function of LIF receptor in motor neurons.* Nature, 1995. **378**(6558): p. 724-7.
139. Bhatt, H., L.J. Brunet, and C.L. Stewart, *Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11408-12.
140. Vogiagis, D., M.M. Marsh, R.C. Fry, and L.A. Salamonsen, *Leukaemia inhibitory factor in human endometrium throughout the menstrual cycle.* J Endocrinol, 1996. **148**(1): p. 95-102.
141. Cullinan, E.B., S.J. Abbondanzo, P.S. Anderson, J.W. Pollard, B.A. Lessey, and C.L. Stewart, *Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(7): p. 3115-20.
142. Sherwin, J.R., S.K. Smith, A. Wilson, and A.M. Sharkey, *Soluble gp130 is up-regulated in the implantation window and shows altered secretion in patients with primary unexplained infertility.* J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(8): p. 3953-60.
143. Kauma, S.W. and D.W. Matt, *Coculture cells that express leukemia inhibitory factor (LIF) enhance mouse blastocyst development in vitro.* J Assist Reprod Genet, 1995. **12**(2): p. 153-6.
144. Fry, R.C., P.A. Batt, R.J. Fairclough, and R.A. Parr, *Human leukemia inhibitory factor improves the viability of cultured ovine embryos.* Biol Reprod, 1992. **46**(3): p. 470-4.
145. van Eijk, M.J., J. Mandelbaum, J. Salat-Baroux, J. Belaisch-Allart, M. Plachot, A.M. Junca, and C.L. Mummery, *Expression of leukaemia inhibitory factor receptor subunits LIFR beta and gp130 in human oocytes and preimplantation embryos.* Mol Hum Reprod, 1996. **2**(5): p. 355-60.

146. Kojima, K., H. Kanzaki, M. Iwai, H. Hatayama, M. Fujimoto, T. Inoue, K. Horie, H. Nakayama, J. Fujita, and T. Mori, *Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta*. Biol Reprod, 1994. **50**(4): p. 882-7.
147. Yang, M., Z.M. Lei, and V. Rao Ch, *The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium*. Endocrinology, 2003. **144**(3): p. 1108-20.
148. Ren, S.G., S. Melmed, and G.D. Braunstein, *Decidual leukemia inhibitory factor production and action on human chorionic gonadotropin secretion at different stages of gestation in vitro*. Early pregnancy: biology and medicine: the official journal of the Society for the Investigation of Early Pregnancy, 1997. **3**(2): p. 102-8.
149. Malassine, A., J.L. Frendo, and D. Evain-Brion, *A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model*. Human reproduction update, 2003. **9**(6): p. 531-9.
150. Orendi, K., M. Gauster, G. Moser, H. Meiri, and B. Huppertz, *The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins*. Reproduction, 2010. **140**(5): p. 759-66.
151. Bode, C.J., H. Jin, E. Rytting, P.S. Silverstein, A.M. Young, and K.L. Audus, *In vitro models for studying trophoblast transcellular transport*. Methods in molecular medicine, 2006. **122**: p. 225-39.
152. Carter, A.M., *Animal models of human placentation – a review*. Placenta, 2007. **28 Suppl A**: p. S41-7.
153. Sullivan, M.H., *Endocrine cell lines from the placenta*. Molecular and cellular endocrinology, 2004. **228**(1-2): p. 103-19.
154. Pattillo, R.A. and G.O. Gey, *The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro*. Cancer research, 1968. **28**(7): p. 1231-6.
155. Pattillo, R.A., G.O. Gey, E. Delfs, and R.F. Mattingly, *In vitro identification of the trophoblastic stem cell of the human villous placenta*. American journal of obstetrics and gynecology, 1968. **100**(4): p. 582-8.
156. Kudo, Y., C.A. Boyd, H. Kimura, P.R. Cook, C.W. Redman, and I.L. Sargent, *Quantifying the syncytialisation of human placental trophoblast BeWo cells grown in vitro*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1640**(1): p. 25-31.

157. Vargas, A., J. Moreau, F. Le Bellego, J. Lafond, and B. Barbeau, *Induction of trophoblast cell fusion by a protein tyrosine phosphatase inhibitor*. Placenta, 2008. **29**(2): p. 170-4.
158. Seamon, K.B., W. Padgett, and J.W. Daly, *Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1981. **78**(6): p. 3363-7.
159. Yoshie, M., K. Kaneyama, K. Kusama, C. Higuma, H. Nishi, K. Isaka, and K. Tamura, *Possible role of the exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac) in the cyclic AMP-dependent functional differentiation and syncytialization of human placental BeWo cells*. Human reproduction, 2010. **25**(9): p. 2229-38.
160. Keryer, G., E. Alsat, K. Tasken, and D. Evain-Brion, *Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro*. Journal of cell science, 1998. **111** (Pt 7): p. 995-1004.
161. Knofler, M., L. Saleh, H. Strohmer, P. Husslein, and M.F. Wolschek, *Cyclic AMP- and differentiation-dependent regulation of the proximal alphaHCG gene promoter in term villous trophoblasts*. Molecular human reproduction, 1999. **5**(6): p. 573-80.
162. Yu, C., K. Shen, M. Lin, P. Chen, C. Lin, G.D. Chang, and H. Chen, *GCMa regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(51): p. 50062-8.
163. Schubert, S.W., A. Abendroth, K. Kilian, T. Vogler, B. Mayr, I. Knerr, and S. Hashemolhosseini, *bZIP-Type transcription factors CREB and OASIS bind and stimulate the promoter of the mammalian transcription factor GCMa/Gcm1 in trophoblast cells*. Nucleic acids research, 2008. **36**(11): p. 3834-46.
164. Budworth, P.R., P.G. Quinn, and J.H. Nilson, *Multiple characteristics of a pentameric regulatory array endow the human alpha-subunit glycoprotein hormone promoter with trophoblast specificity and maximal activity*. Molecular endocrinology, 1997. **11**(11): p. 1669-80.
165. Johnson, W., C. Albanese, S. Handwerger, T. Williams, R.G. Pestell, and J.L. Jameson, *Regulation of the human chorionic gonadotropin alpha- and beta-subunit promoters by AP-2*. The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(24): p. 15405-12.

166. Albanese, C., T.W. Kay, N.M. Troccoli, and J.L. Jameson, *Novel cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element in the human chorionic gonadotropin beta-subunit gene*. *Molecular endocrinology*, 1991. **5**(5): p. 693-702.
167. Drewlo, S., D. Baczyk, C. Dunk, and J. Kingdom, *Fusion assays and models for the trophoblast*. *Methods in molecular biology*, 2008. **475**: p. 363-82.
168. Kliman, H.J., J.E. Nestler, E. Sermasi, J.M. Sanger, and J.F. Strauss, 3rd, *Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae*. *Endocrinology*, 1986. **118**(4): p. 1567-82.
169. Smith, G.C., E.J. Stenhouse, J.A. Crossley, D.A. Aitken, A.D. Cameron, and J.M. Connor, *Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein a and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth*. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2002. **87**(4): p. 1762-7.
170. Wich, C., S. Kausler, J. Dotsch, W. Rascher, and I. Knerr, *Syncytin-1 and glial cells missing a: hypoxia-induced deregulated gene expression along with disordered cell fusion in primary term human trophoblasts*. *Gynecologic and obstetric investigation*, 2009. **68**(1): p. 9-18.
171. Ruebner, M., P.L. Strissel, M. Langbein, F. Fahlbusch, D.L. Wachter, F. Faschingbauer, M.W. Beckmann, and R. Strick, *Impaired cell fusion and differentiation in placentae from patients with intrauterine growth restriction correlate with reduced levels of HERV envelope genes*. *Journal of molecular medicine*, 2010. **88**(11): p. 1143-56.
172. Dimitriadis, E., E. Menkhorst, L.A. Salamonsen, and P. Paiva, *Review: LIF and IL11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy*. *Placenta*, 2010. **31 Suppl**: p. S99-104.
173. Zhang, J.J., U. Vinkemeier, W. Gu, D. Chakravarti, C.M. Horvath, and J.E. Darnell, Jr., *Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996. **93**(26): p. 15092-6.
174. Bhattacharya, S., R. Eckner, S. Grossman, E. Oldread, Z. Arany, A. D'Andrea, and D.M. Livingston, *Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-alpha*. *Nature*, 1996. **383**(6598): p. 344-7.

175. Paulson, M., S. Pisharody, L. Pan, S. Guadagno, A.L. Mui, and D.E. Levy, *Stat protein transactivation domains recruit p300/CBP through widely divergent sequences*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(36): p. 25343-9.
176. Pfitzner, E., R. Jahne, M. Wissler, E. Stoecklin, and B. Groner, *p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response*. Molecular endocrinology, 1998. **12**(10): p. 1582-93.
177. Gingras, S., J. Simard, B. Groner, and E. Pfitzner, *p300/CBP is required for transcriptional induction by interleukin-4 and interacts with Stat6*. Nucleic acids research, 1999. **27**(13): p. 2722-9.
178. Sakatsume, M., L.F. Stancato, M. David, O. Silvennoinen, P. Saharinen, J. Pierce, A.C. Lerner, and D.S. Finbloom, *Interferon gamma activation of Raf-1 is Jak1-dependent and p21ras-independent*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(5): p. 3021-6.
179. Liu, M.K., R.W. Brownsey, and N.E. Reiner, *Gamma interferon induces rapid and coordinate activation of mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase) and calcium-independent protein kinase C in human monocytes*. Infection and immunity, 1994. **62**(7): p. 2722-31.
180. Hallast, P., K. Rull, and M. Laan, *The evolution and genomic landscape of CGB1 and CGB2 genes*. Molecular and cellular endocrinology, 2007. **260-262**: p. 2-11.
181. Loregger, T., J. Pollheimer, and M. Knofler, *Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast – a review*. Placenta, 2003. **24 Suppl A**: p. S104-10.
182. Cheng, Y.H., B.J. Aronow, S. Hossain, B. Trapnell, S. Kong, and S. Handwerger, *Critical role for transcription factor AP-2alpha in human trophoblast differentiation*. Physiological genomics, 2004. **18**(1): p. 99-107.
183. Chan, L.L., B.K. Cheung, J.C. Li, and A.S. Lau, *A role for STAT3 and cathepsin S in IL-10 down-regulation of IFN-gamma-induced MHC class II molecule on primary human blood macrophages*. Journal of leukocyte biology, 2010. **88**(2): p. 303-11.
184. Krebs, D.L. and D.J. Hilton, *SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling*. Stem Cells, 2001. **19**(5): p. 378-87.

185. Piessevaux, J., D. Lavens, F. Peelman, and J. Tavernier, *The many faces of the SOCS box*. Cytokine & growth factor reviews, 2008. **19**(5-6): p. 371-81.
186. Li, M., Y. Wang, M.C. Hung, and P. Kannan, *Inefficient proteasomal-degradation pathway stabilizes AP-2alpha and activates HER-2/neu gene in breast cancer*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2006. **118**(4): p. 802-11.
187. Ungureanu, D., P. Saharinen, I. Junttila, D.J. Hilton, and O. Silvennoinen, *Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1*. Molecular and cellular biology, 2002. **22**(10): p. 3316-26.
188. Takahashi, Y., M. Takahashi, N. Carpino, S.T. Jou, J.R. Chao, S. Tanaka, Y. Shigeyoshi, E. Parganas, and J.N. Ihle, *Leukemia inhibitory factor regulates trophoblast giant cell differentiation via Janus kinase 1-signal transducer and activator of transcription 3-suppressor of cytokine signaling 3 pathway*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(7): p. 1673-81.
189. Wald, N.J., H.S. Cuckle, J.W. Densem, K. Nanchahal, P. Royston, T. Chard, J.E. Haddow, G.J. Knight, G.E. Palomaki, and J.A. Canick, *Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy*. BMJ, 1988. **297**(6653): p. 883-7.

ANNEXE A

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

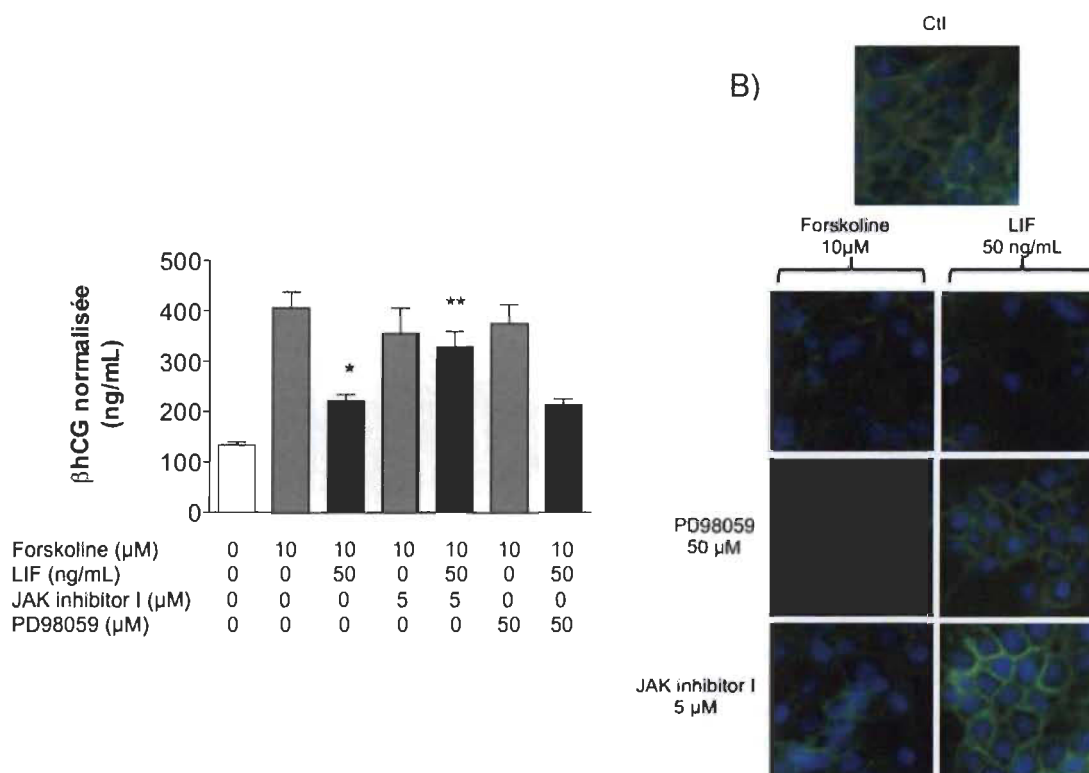


Figure A.1 : Rôle des voies JAK/STAT et MAPK3/1 MAP kinase dans la différenciation biochimique et morphologique des cellules BeWo.

Les cellules ont été pré-traitées durant 60 minutes avec les inhibiteurs pharmacologiques ou du DMSO, puis traitées durant 48h avec 10 μM forskoline ou 50 ng/mL LIF en présence de 10 μM forskoline. (A) Différenciation biochimique. La concentration en βhCG a été mesurée dans les surnageants des cultures par ELISA. Les données présentées représentent la moyenne ± SEM de trois expériences différentes faites en triplicata. * $p < 0.001$ réduction significative lorsque compare à la forskoline seule; ** $p < 0.001$ augmentation significative lorsque compare à la forskoline en présence de LIF. (B) Différenciation morphologique. L'expression de la E-cadhérine (en vert) a été évaluée par immunofluorescence. Les noyaux ont été colorés avec le Hoescht 33258. Toutes les observations ont été faites à 20X. Des résultats similaires ont été obtenus lors de trois expériences indépendantes et cinq champs aléatoires ont été examinés lors de chaque réplicat.

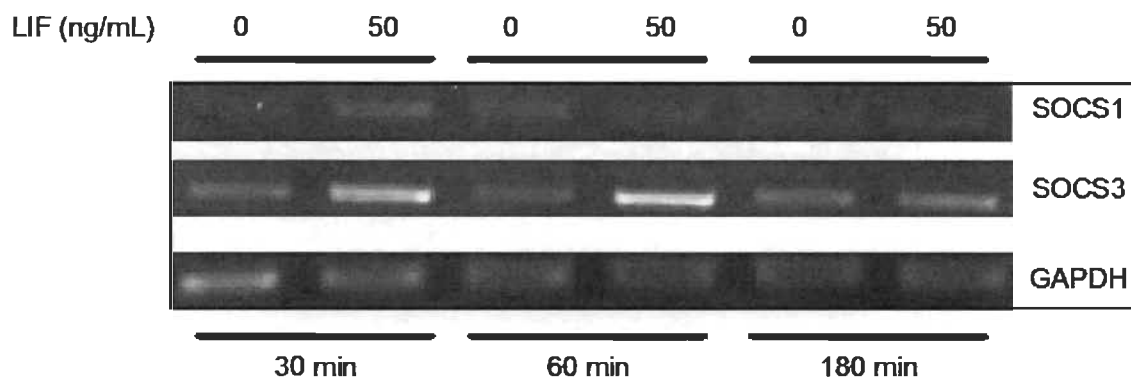


Figure A.2 : Influence du LIF sur l'expression de l'ARNm de SOCS1 et SOCS3.

Les cellules BeWo ont été traitées avec du milieu de culture seul ou supplémenté de 50 ng/mL LIF durant 30, 60 ou 180 minutes après lesquelles l'ARN a été extrait. Un RT-PCR visant la détermination de l'expression de l'ARNm correspondant aux protéines SOCS1 et SOCS3 a été fait. Il apparaît que le LIF induit l'expression du transcrit de SOCS1 et SOCS3, ce second de manière plus importante, mais que cette induction soit transitoire, atteignant un maximum après 30 minutes pour SOCS1 et 60 minutes de stimulation dans le cas de SOCS3.